

D i s s e r t a t i o n

Die Bedeutung von CD96 für das inflammatorische Potenzial IL-9-produzierender T-Helferzellen

zur Erlangung des akademischen Grades
d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat)

im Fach Biologie

eingereicht an der
Lebenswissenschaftlichen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

M. Sc. Katarina Stanko

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät
Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. Hans-Dieter Volk
2. Prof. Dr. Birgit Sawitzki
3. Prof. Dr. Alexander Scheffold

Datum der mündlichen Prüfung: 16. November 2018

„Was ich an der Wissenschaft so liebe, ist, dass man
beim Forschen eigentlich keine Antworten findet.

Man findet nur bessere Fragen.“

aus

Schlaft gut, ihr fiesen Gedanken (John Green)

I Zusammenfassung	8
II Abstract.....	9
III Abkürzungen	10
1. Einleitung.....	13
1.1 Einführung	13
1.2 T-Zellen als Komponenten des adaptiven Immunsystems	13
1.3 Die Bedeutung von ko-stimulatorischen und ko-inhibitorischen Signalen auf T-Zellen	14
1.3.1 Aktivierung von T-Zellen	14
1.3.2 Ko-Stimulation durch CD28.....	15
1.3.3 Ko-Inhibition durch CTLA-4	16
1.3.4 Weitere ko-signalisierende Rezeptoren auf T-Zellen	17
1.4 Das CD226/TIGIT/CD96-Rezeptornetzwerk	19
1.4.1 Der aktivierende Rezeptor CD226 und der inhibierende Rezeptor TIGIT	19
1.4.2 CD96 – ein Molekül mit unklarer Funktion in T-Zellen	20
1.4.2.1 Struktur und Signaltransduktion.....	20
1.4.2.2 Funktion in Zellen mit zytotoxischer Funktion	20
1.5 Die Diversität der CD4 ⁺ T-Helferzellen	22
1.5.1 Th9-Zellen.....	23
1.5.1.1 Differenzierung und transkriptionelles Netzwerk	24
1.5.1.2 IL-9 – ein Th9-Zytokin?.....	26
1.5.1.3 Bedeutung für das Immunsystem	26
1.6 Zielsetzung.....	31
2. Material und Methoden	33
2.1 Material	33
2.1.1 Antikörper	33
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien	33
2.1.3 Chirurgische Instrumente	34
2.1.4 Geräte.....	34
2.1.5 Kommerzielle Versuchssysteme	35
2.1.6 Mausstämme.....	35
2.1.7 Medikamente	36
2.1.8 Rekombinante Proteine (Zytokine, Stimulanzen)	36
2.1.9 Software	36
2.1.10 Verbrauchsmaterial.....	36
2.1.11 Zusammensetzung von Puffern und Medien	37
2.2 Methoden.....	38
2.2.1 Zellkultur.....	38
2.2.1.1 Allgemeines.....	38

2.2.1.2	Gewinnung reifer dendritischer Zellen aus Knochenmarkzellen	38
2.2.1.3	Gewinnung primärer CD4 ⁺ T-Zellen und CD19 ⁺ B-Zellen.....	39
2.2.1.4	Gemischte Leukozytenkultur	40
2.2.2	Durchflusszytometrie	41
2.2.2.1	Detektion von extra- und intrazellulären Proteinen	41
2.2.2.2	Fluoreszenzbasierte Zellsortierung.....	43
2.2.2.3	Bestimmung der Zytokinkonzentration im Zellkulturüberstand	44
2.2.3	Molekularbiologische Methoden	44
2.2.3.1	Extraktion von RNA	44
2.2.3.2	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	44
2.2.3.3	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	45
2.2.3.4	qPCR-Array (Genexpressionsarray).....	46
2.2.3.5	Einzelzell-Genexpressionsanalyse.....	46
2.2.4	<i>In vivo</i> Methoden	49
2.2.4.1	Applikation von Zellen und Antikörpern.....	49
2.2.4.2	Allogene Hauttransplantation.....	50
2.2.5	Histologie.....	51
2.2.6	Statistik	52
3.	Ergebnisse.....	53
3.1	Eigenschaften <i>in vitro</i> differenzierter allo-reaktiver CD4 ⁺ Th9-Zellen.....	53
3.1.1	Fähigkeit zur IL-9-Produktion	53
3.1.2	Optimierung und Stabilität.....	55
3.1.3	Einfluss von PMA und Ionomycin.....	56
3.2	Das Zytokinprofil nach allogener Hauttransplantation.....	57
3.3	Das inflammatorische Potenzial <i>in vitro</i> differenzierter Th9-Zellen	58
3.3.1	Effekt auf Transplantatüberleben und Gewicht	58
3.3.2	Th9-vermittelte Darmentzündung	59
3.4	Phänotypische Charakterisierung <i>in vitro</i> differenzierter Th9-Zellen	60
3.4.1	Einzigartiger Aktivierungsphänotyp	60
3.4.2	Expression Treg-spezifischer Moleküle.....	62
3.5	Die Heterogenität <i>in vitro</i> differenzierter Th9-Zellen	63
3.5.1	Heterogene Expression von IL-4	63
3.5.2	Weitere Untersuchung von IL-4 ⁺ IL-9 ⁺ und IL-4 ^{neg} IL-9 ⁺ Th9-Zellen.....	64
3.5.3	Genexpression auf Einzelzell-Ebene	65
3.6	CD96-Expressionskinetik und Charakterisierung von CD96 ^{high} und CD96 ^{low} Th9-Zellen	69
3.6.1	Verlauf der CD96-Expression über die Zeit.....	69
3.6.2	Expression von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren	70
3.6.3	Stabilität nach Re-Aktivierung.....	72
3.7	Inflammatorische Eigenschaften von CD96 ^{high} und CD96 ^{low} Th9-Zellen.....	72

3.7.1	Gewicht, Darmentzündung und Transplantatüberleben	72
3.7.2	Gewebsinfiltration und Expansion	74
3.7.3	Zytokinprofil der re-isolierten T-Zellen	76
3.7.4	CD96-Expression in den re-isolierten T-Zellen	77
3.8	Inflammatorische Eigenschaften in Anwesenheit endogener T-Zellen.....	78
3.9	Effekt der Antikörper-vermittelten Blockade von CD96.....	79
3.9.1	Blockade <i>in vivo</i>	79
3.9.2	Blockade <i>in vitro</i>	81
4.	Diskussion	83
4.1	<i>In vitro</i> Differenzierung von antigenspezifischen Th9-Zellen	84
4.1.1	Die MLC als physiologisches Modell zur Untersuchung von Th-Zellfunktionen	84
4.1.2	LPS-stimulierte DC schaffen ein Th9-begünstigendes Zytokinmilieu	85
4.2	Die inflammatorischen Eigenschaften von allo-reaktiven Th9-Zellen.....	86
4.2.1	Die kolitogene Potenz von Th9-Zellen im Vergleich zu Th1-Zellen	86
4.2.2	Hohes kolitogenes Potenzial trotz geringem Aktivierungsgrad?	87
4.3	Besonderheiten von CD96 ^{low} und CD96 ^{high} Th9-Zellen	89
4.3.1	IL-9 und weitere inflammatorische Mediatoren	89
4.3.2	Transkriptionelle Kontrolle der Th9-Subpopulationen.....	89
4.3.3	CD96 – ein T-Zell-Erschöpfungsmarker?	90
4.4	<i>In vivo</i> Stabilität von Th9-Zellen	92
4.5	Die klinische Relevanz von CD96.....	94
4.5.1	Bedeutung als Biomarker.....	94
4.5.2	Bedeutung als <i>Checkpoint</i> -Inhibitor für die Krebsimmuntherapie	94
4.5.3	Bedeutung für die Therapie chronisch entzündlicher Erkrankungen	95
4.6	Ausblick.....	97
5.	Danksagung	99
6.	Referenzen.....	100
7.	Appendix.....	111
7.1	Konfiguration der Durchflusszytometer	111
7.1.1	LSRFortessa (18 Farben)	111
7.1.2	LSRII (12 Farben)	111
7.1.3	FACSCalibur (4 Farben)	112
7.2	Datenbanksuche für AU-reiche Elemente in der 3' UTR der murinen <i>Il9</i> mRNA.....	112
8.	Selbstständigkeitserklärung.....	114

I Zusammenfassung

CD4⁺ T-Zellen spielen eine zentrale Rolle für die Kontrolle von Immunantworten gegenüber Pathogenen, aber auch im Rahmen unerwünschter Immunreaktionen wie chronischen Entzündungen. Als T-Helfer-(Th-)Zellen differenzieren sie in Subgruppen mit distinkten Zytokinprofilen und Funktionen. Gegenwärtig sind mindestens sechs verschiedene Th-Zelltypen (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 und Tfh) beschrieben, welche die Abwehr von unterschiedlichen Erregertypen (z. B. intra- *versus* extrazellulär) kontrollieren.

Th9-Zellen wurden erstmals 2008 als eigenständige Th-Subgruppe beschrieben und zählen zu den potentesten IL-9-Produzenten des Körpers. Diese Zellen sind noch nicht vollständig erforscht, aber es ist bekannt, dass sie bei parasitären Wurmerkrankungen und gegenüber malignen Tumoren eine protektive Immunantwort auslösen können. Gleichzeitig sind sie auch maßgeblich an der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankung Colitis ulcerosa beteiligt. Im Widerspruch zu den genannten entzündungsauslösenden Eigenschaften steht ihre Funktion bei der Erzeugung von Toleranz gegenüber allogenen Transplantaten. Diese entgegengesetzten inflammatorischen Eigenschaften deuten eine funktionelle Heterogenität an, die bisher nicht untersucht wurde.

In der vorliegenden Arbeit konnte ich zeigen, dass *in vitro*-differenzierte allo-reaktive Th9-Zellen in ihrer Gesamtheit einen pro-inflammatorischen Charakter besaßen. Dieser äußerte sich nach Transfer in *recombination activating gene*-defiziente (*Rag*^{-/-}) Mäuse durch einen rasch einsetzenden Gewichtsverlust mit akuter intestinaler Entzündung und der Abstoßung eines allogenen Hauttransplantats. Eine Genexpressionsanalyse auf Einzelzell-Ebene führte zur Identifizierung von zwei Th9-Subpopulationen, die sich vor allem in der Expression des Oberflächenmoleküls CD96 unterschieden (CD96^{low} *versus* CD96^{high} Th9-Zellen). Unpolarisierte und Th1-polarisierte Zellen wiesen dagegen keine heterogene CD96-Expression auf. Die differenzielle Expression von CD96 spiegelte sich auch im inflammatorischen Potenzial der Th9-Zellen wider. Während der Transfer von CD96^{low} Th9-Zellen in *Rag*^{-/-} Mäuse wieder einen akuten Gewichtsverlust, eine Entzündung von Ileum und Kolon sowie eine Transplantatzerstörung verursachte, zeigten CD96^{high}-rekonstituierte Tiere kaum Anzeichen einer Entzündung im Transplantat oder Darm und verloren entsprechend kein Gewicht. Es zeigte sich, dass CD96^{low} Th9-Zellen ein wesentlich höheres Potenzial zur Produktion von IL-4, IL-9 und (tendenziell) IL-5 sowie zur Expansion besaßen, obwohl der Th9-Differenzierungsgrad beider Subpopulationen vergleichbar war. Eine Blockade von CD96 *in vivo* stellte die inflammatorischen Eigenschaften von CD96^{high} Th9-Zellen wieder her und demonstrierte damit die funktionelle Relevanz der CD96-Expression.

Diese Daten lassen einerseits die Behauptung zu, dass die widersprüchlichen Berichte über die inflammatorische Potenz von Th9-Zellen mit der Dominanz einer der beiden Th9-Subpopulation begründet werden kann. Andererseits zeigen sie, dass CD96 – ein Molekül mit bislang unklarer Funktion in T-Zellen – die Aktivität von Th9-Zellen negativ beeinflusst. Zukünftige Untersuchungen müssen zeigen, inwieweit diese Erkenntnis auf andere T-Helferzellen ausgeweitet und in therapeutische Anwendungen umgesetzt werden kann.

II Abstract

CD4⁺ T cells critically control immune responses towards pathogens but also contribute to the development of unwanted immune reactions such as chronic inflammatory diseases. Upon activation, they differentiate into distinct T helper (Th) cells with characteristic cytokine profiles and functions. Currently, at least six different Th cell subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 and Tfh) are known to achieve effective responses towards different types of pathogens, e.g. intracellular *versus* extracellular agents.

Th9 cells are potent producers of IL-9 and were shown in 2008 to represent a distinct subset of CD4⁺ effector T cells. They have not been fully investigated yet, but they are known to drive host immunity against parasitic worm infections and malignant tumors. On the other hand, they are predominantly involved in the pathogenesis of ulcerative colitis, a form of chronic inflammatory bowel diseases. However, they also induce tolerance in allogeneic transplantation, which contrasts with their pro-inflammatory properties. These observations indicate a functional heterogeneity of Th9 cells not examined so far.

Total *in vitro* differentiated allo-reactive Th9 cells injected into recombination activating gene-deficient (*Rag*^{-/-}) mice caused weight loss, intestinal inflammation and rejection of allogeneic skin grafts which proofed their inflammatory character. However, using single cell profiling, two subsets of Th9 cells mainly differing in CD96 expression were identified (CD96^{low} *versus* CD96^{high} Th9 cells). Importantly, this diversity was not observed in allo-reactive Th1 or non-polarized T cells. Transfer of CD96^{low} Th9 cells into *Rag*^{-/-} mice induced severe weight loss, intestinal and colonic inflammation and graft destruction. In contrast, transfer of CD96^{high} Th9 cells did cause neither weight loss nor changed epidermal organization of the allografts. Transcriptional profiling revealed that both subsets were committed to Th9 differentiation but CD96^{low} Th9 cells were characterized by higher IL-9, IL-4 and (by tendency) IL-5 expression potential as well as increased expansion capacity. Blockade of CD96 *in vivo* restored the inflammatory properties of CD96^{high} Th9 cells demonstrating, that expression of CD96 controls effector functions in Th9 cells.

Thus, the predominance of either CD96^{high} or CD96^{low} Th9 cells during immune responses may account for the contradictory reports on the inflammatory potential of Th9 cells. Moreover, this study suggests an inhibitory role for the co-signaling receptor CD96 – a molecule with so far unknown function in CD4⁺ T cells – in Th9 cells. Further experiments will reveal, whether CD96 also exercises inhibitory signals in other Th subsets as well as the therapeutic potential of CD96-mediated immune inhibition.

III Abkürzungen

% v/v	Volumen/Volumen (Volumenprozent)
% w/v	<i>Weight/volume</i> (Massenkonzentration)
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AF700	Alexa Fluor 700
AP-1	<i>Activator protein-1</i>
APC	Allophycocyanin
APZ	(Professionelle) antigenpräsentierende Zelle
ARE	Adenin- und Uridin-reiche Elemente
Asn	Asparagin
B2m	β2-Mikroglobulin
BATF	<i>Basic leucine zipper ATF-like transcription factor</i>
bp	Basenpaare
BP	<i>Band pass</i> (optischer Filter)
BSA	Bovines Serumalbumin
BV	<i>Brilliant violet</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD40L	CD40-Ligand
cDNA	<i>Complementary desoxyribonukleic acid</i>
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct	<i>Theshold cycle</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
Cy7	Cyanin 7
d. h.	das heißt
DC	<i>Dendritic cell</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNAM-1	<i>DNAX accessory molecule-1</i>
DPP4	Dipeptidylpeptidase 4
DRFZ	Deutsches Rheuma-Forschungszentrum (Berlin)
dUTP	2'-Deoxyuridin 5'-Triphosphat
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat.)
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
Fc	<i>Fragment crystallisable</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FFPE	<i>Formaldehyde-fixed paraffin-embedded</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Foxp3	<i>Forkhead-Box-Protein 3</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
GATA-3	<i>GATA binding protein-3</i>
GITR	<i>Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
gMFI	<i>Geometric mean fluorescence intensity</i>
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPF	<i>High power field</i>
Hprt	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
<i>i. p.</i>	<i>intra peritoneum</i> (lat.)
<i>i. v.</i>	<i>intra vena</i> (lat.)

ICOS	<i>Inducible T cell costimulator</i>
IFC	<i>Integrated fluidic circuits</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
Ig-SF	Immunglobulin-Superfamilie
IL	Interleukin
IL-9R	IL-9-Rezeptor
ILC	<i>Innate lymphoid cell</i>
IQS	Interquartilsspanne
irAE	<i>Immune-related adverse events</i>
IRF	Interferon-regulierender Faktor 4
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
ITT	<i>Immunoglobulin tail tyrosine</i>
JAK	Januskinase
KG	Körpergewicht
lat.	lateinisch
li.	links
LOD	<i>Limit of detection</i>
LP	<i>Long pass</i> (optischer Filter)
LPS	Lipopolysaccharid
Lys	Lysin
MACS	<i>Magnetic activated cell separation</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Met	Methionin
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MLC	<i>Mixed leukocyte culture</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MW	Mittelwert
n. s.	nicht signifikant ($p > 0,05$)
NaN ₃	Natriumazid
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
Nrp-1	Neuropilin-1
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein-1</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
qRT-PCR	<i>Quantitative Reverse-Transkriptase Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion</i>
Rag	<i>Recombination activating gene</i>
re.	rechts
RT	Raumtemperatur
s. c.	<i>sub cutis</i> (lat.)
SB	<i>Stratum basale</i>
SC	<i>Stratum corneum</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SG	<i>Stratum granulosum</i>
SH2	Src-Homologie 2 Protein
SHIP	SH2-Domäne-enhaltende Inositol-Polyphosphat-5-Phosphatase

SHP-1 bzw. -2	SH2-Domäne-enthaltende Phosphatase-1 bzw. -2
SP	<i>Short pass</i> (optischer Filter)
SS	<i>Stratum spinosum</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TACTILE	<i>T cell-activated increased late expression</i>
T-bet	<i>T-box expressed in T cells</i>
TCF1	<i>T-cell specific transcription factor 1</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
Th-Zelle	T-Helferzelle
TIGIT	<i>T-cell immunoglobulin and ITIM domain</i>
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNFR-SF	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
(t)Treg-Zelle	(im Thymus entstandene) regulatorische T-Zelle
Tx	Transplantation
Tyr	Tyrosin
TZR	T-Zellrezeptor
UC	<i>Ulcerative colitis</i>
UNG	Uracil-N-Glycosylase
UTR	untranslatierte Region
Val	Valin
vgl.	vergleiche
VLE	<i>Very low endotoxin</i>
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

1. Einleitung

1.1 Einführung

Das Immunsystem ist ein komplexes Netzwerk aus spezialisierten Zellen, lymphoiden Organen und löslichen Faktoren. Es besitzt die Fähigkeit, körpereigene Strukturen zu tolerieren, während potenzielle Krankheitserreger oder entartete Körperzellen erkannt werden und eine Immunantwort auslösen.

Sobald ein Erreger die mechanischen und biochemischen Barrieren des Körpers überwunden hat, reagiert das angeborene Immunsystem. Zu dessen zellulären Komponenten zählen neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten sowie Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen, Mastzellen und natürliche Killerzellen. Das zentrale Prinzip der angeborenen Immunantwort ist die Erkennung eines breiten Erregerspektrums anhand pathogenassoziierter molekularer Muster durch keimbahnkodierte Rezeptoren. Infolgedessen wird bereits ein großer Teil der Erreger phagozytiert und durch toxische Sauerstoffderivate abgetötet. Zeitgleich produzieren die aktivierten Zellen des angeborenen Immunsystems Zytokine und lösen damit die Aktivierung der erworbenen (adaptiven) Immunantwort aus. Dieser Teil des Immunsystems reagiert insbesondere beim ersten Erregerkontakt langsam, aber aufgrund variabler antigenspezifischer Rezeptoren mit sehr hoher Spezifität. Zudem entwickeln die Zellen des adaptiven Immunsystems ein immunologisches Gedächtnis, das bei erneutem Erregerkontakt schneller reagieren kann und somit vor einer Re-Infektion schützt.

Doch nicht immer agiert das Immunsystem zu unserem Vorteil. Vor allem in Industrienationen leiden immer mehr Menschen unter einem Immunsystem, das harmlose Umweltantigene oder körpereigene Strukturen als fremd erkennt. Die Folgen sind allergische Erkrankungen wie Asthma bronchiale und Autoimmunreaktionen wie bei Diabetes mellitus Typ 1. Auch bei der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa ist ein schädigender Einfluss des Immunsystems eindeutig belegt. Ein weiteres Beispiel für eine unerwünschte Immunreaktion ist die Abstoßung eines transplantierten Organs. Um das Immunsystem in diesen Situationen gezielt und mit minimaler Beeinträchtigung der lebensnotwendigen Abwehrfunktionen therapeutisch modulieren zu können, muss die pathologische Komponente des Immunsystems so genau wie möglich verstanden werden.

1.2 T-Zellen als Komponenten des adaptiven Immunsystems

Die Hauptakteure des adaptiven Immunsystems sind T- und B-Lymphozyten mit ihren jeweiligen Effektormolekülen. Während T-Zellen die zelluläre Verteidigungslinie darstellen, bilden Antikörper-produzierende Plasmazellen der B-Zell-Linie die humorale (von lat. *umor*, Flüssigkeit) Immunabwehr.

Es besteht ein grundlegender Unterschied in der Art, wie B- und T-Zellen ihr spezifisches Antigen erkennen. B-Zellen können mit ihrem B-Zellrezeptor freies und intaktes Antigen

binden. Dagegen erkennen T-Zellen ausschließlich Proteinfragmente (Peptide), die von körpereigenen Zellen degradiert und an ihrer Zelloberfläche von Molekülen der Haupthistokompatibilitätskomplexe (*major histocompatibility complex*, MHC) präsentiert werden. Durch diesen Mechanismus werden nicht nur extra-, sondern auch intrazelluläre Erreger sowie entartete Körperzellen für das Immunsystem sichtbar gemacht (1).

Entsprechend ihrer Funktion und der von ihnen erkannten Antigene werden T-Zellen in CD8⁺ zytotoxische T-Zellen und CD4⁺ T-Helferzellen unterteilt. CD8⁺ T-Zellen erkennen ihr Antigen über MHC-Klasse-I-Proteine. Diese Moleküle werden von allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert und präsentieren eine Vielfalt an zumeist endogenen Selbst-Peptiden. Da autoreaktive T-Zellen bereits im Thymus im Zuge der Negativselektion eliminiert wurden, tolerieren CD8⁺ T-Zellen gesunde Körperzellen. Binden sie dagegen an Fragmente von mutierten (z. B. Krebszellen), mikrobiellen (bei viralen Infektionen) oder polymorphen (Transplantat) Genprodukten, wird die Ausschüttung zytotoxischer Effektormoleküle und damit die Lyse der präsentierenden Zelle initiiert [zusammengefasst in (2)].

CD4⁺ T-Zellen sind an die Antigenerkennung im MHC-Klasse-II-Kontext gebunden. Diese Moleküle werden nicht ubiquitär exprimiert und befinden sich in erster Linie auf dendritischen Zellen (*dendritic cell*, DC), Monozyten/Makrophagen und B-Zellen. Sie nehmen durch Rezeptorvermittelte Endozytose kontinuierlich Antigene aus der näheren Umgebung auf und präsentieren demnach eine Mischung aus exogenen körpereigenen und -fremden Peptiden. Aufgrund der großen Bedeutung für die Initiierung einer erregerspezifischen T-Zellantwort werden diese Zellen als *professionelle* antigenpräsentierende Zellen (APZ) bezeichnet. Darüber hinaus ist die Expression von MHC-II unter bestimmten Bedingungen auch in anderen Zellen des angeborenen Immunsystems wie z. B. basophilen und neutrophilen Granulozyten oder Mastzellen induzierbar. Sie werden als *atypische* antigenpräsentierende Zellen bezeichnet, aber es ist unklar, ob sie eine antigenspezifische T-Zellaktivierung auslösen können. Ferner exprimieren auch nicht-hämatopoetische Zellen wie Epithel-, Endothel- und Stromazellen zum Teil sogar konstitutiv Peptid-beladene MHC-Klasse-II-Moleküle. Ihnen kommt wahrscheinlich eine große Bedeutung bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der T-Zell-Toleranz gegenüber körpereigenen Peptiden zu [zusammengefasst in (3)].

1.3 Die Bedeutung von ko-stimulatorischen und ko-inhibitorischen Signalen auf T-Zellen

1.3.1 Aktivierung von T-Zellen

Für eine vollständige T-Zellaktivierung ist die Erkennung eines MHC-gebundenen Peptids allein nicht ausreichend. In diesem Zusammenhang wird die Erkennung des Antigens durch den T-Zellrezeptor (TZR) als Signal 1 bezeichnet und bewirkt nur in Verbindung mit einem ko-stimulatorischen Signal (Signal 2) die Produktion des T-Zellwachstumsfaktors Interleukin-(IL)-2 (Abb. 1-1). Im Unterschied zum TZR-Signal werden ko-stimulatorische Signale antigen-unabhängig ausgelöst. Für die Differenzierung der aktivierten T-Zelle in eine spezifische

Effektorzelle ist überdies ein drittes Signal in Form von Zytokinen notwendig. Laut klassischem Zwei-Zell-Modell werden diese bei $CD4^+$ T-Zellen, ebenso wie die Signale 1 und 2, von der APZ geliefert. Es wird jedoch auch diskutiert, ob dafür die Beteiligung einer weiteren Zellpopulation des angeborenen Immunsystems z. B. natürliche Killerzellen oder Mastzellen erforderlich ist (Drei-Zell-Modell) (4, 5). Erhält eine T-Zelle nur das Signal 1, verharrt sie in einem funktionell inaktivierten Status ohne, dass der programmierte Zelltod eintritt. Dieser Zustand wird als Anergie bezeichnet und spielt ebenfalls eine große Rolle bei der zentralen und peripheren Toleranzinduktion [zusammengefasst in (6)].

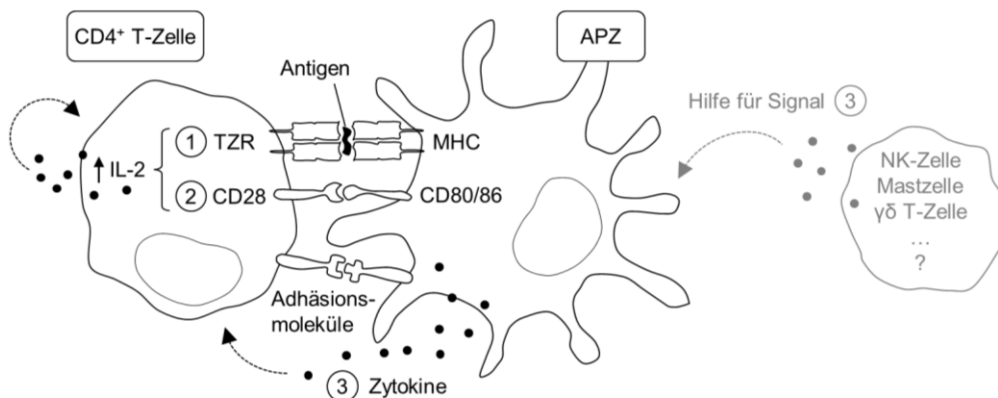


Abb. 1-1. Vereinfachtes Modell der T-Zellaktivierung am Beispiel einer $CD4^+$ T-Zelle. Eine professionelle antigenpräsentierende Zelle (APZ) liefert verschiedene Signale, die für die vollständige Aktivierung einer T-Zelle notwendig sind. Die Erkennung des MHC-präsentierten Antigens durch den T-Zellrezeptor (TZR) wird als Signal ① bezeichnet. Die Interaktion des ko-stimulatorischen Rezeptors CD28 mit den Molekülen CD80 und CD86 auf der APZ (s. Abschnitt 1.3.2) liefert Signal ②. Die Signale 1 und 2 induzieren zusammen die Ausschüttung des autokrinen T-Zell-Wachstumsfaktors IL-2. Das Signal ③ besteht aus Zytokinen, die von der APZ sekretiert werden und die Differenzierung der aktivierten Zelle steuern. Es wird diskutiert (hellgrau), ob dafür die Hilfe von weiteren Zellen des angeborenen Immunsystems erforderlich ist. NK-Zelle, natürliche Killerzelle.

1.3.2 Ko-Stimulation durch CD28

Der Prototyp eines ko-stimulatorischen Signals (Signal 2) ist die Interaktion von CD28 auf $CD4^+$ T-Zellen mit den Liganden CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) auf den APZ (**Tab. 1-1**). CD28 wird von den meisten ruhenden und aktivierten $CD4^+$ T-Zellen exprimiert [zusammengefasst in (7)]. Erst mit zunehmender Dauer des Antigenstimulus verlieren die Zellen ihre CD28-Expression. Damit übereinstimmend steigt im Alter aufgrund der zunehmenden Antigenerfahrung die Frequenz an $CD28^{neg}$ T-Zellen [zusammengefasst in (8)]. Im Gegensatz zur aktivierungsunabhängigen Expression von CD28 werden die Bindungspartner CD80 und CD86 nur in *geringen* Mengen von ruhenden APZ exprimiert. Ihre Expression steigt erst nach Aktivierung durch einen inflammatorischen Stimulus an. Dendritische Zellen (*dendritic cell*, DC) weisen die höchste Expression von CD80 und CD86 auf, wohingegen die Liganden auf Stroma- und Epithelzellen gänzlich fehlen [zusammengefasst in (7)]. CD80 und CD86 besitzen überlappende Funktionen (9, 10), unterscheiden sich aber in ihrer Expressionskinetik (11).

Die Bindung von CD28 an CD80/86 initiiert eine Signalkaskade, die zur Amplifizierung des TZR-Signals führt und die klonale Expansion der T-Zelle zur Folge hat. CD28 selbst besitzt keine enzymatische Aktivität. In seinem zytoplasmatischen Abschnitt verfügt es stattdessen über ein hochkonserviertes, Tyrosin-basiertes Bindungsmotiv, die Tyr-x-x-Met-(YxxM-)Abfolge (x kennzeichnet eine beliebige Aminosäure). Die spezielle CD28-Sequenz Tyr-Val-Asn-Met (YMNМ) wird nach CD80/86-Ligation an ihrem Tyrosinrest phosphoryliert und kann anschließend von der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und *growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2) über eine Src-Homologie 2 Protein-(SH2-)Domäne gebunden werden. Durch die Aktivität der PI3K steigt die Produktion der sekundären Botenstoffe Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) und Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP3) an, wodurch weitere Proteine wie die Phosphoinositid-abhängige Kinase-1 (PDK1) rekrutiert werden. Diese führen Proteinkinase B (PKB)/Akt-abhängig zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF-κB) und *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT), welche die Transkription des anti-apoptotisch wirkenden Proteins Bcl-X_L und des autokrinen T-Zell-Wachstumsfaktors IL-2 induzieren. Die Interaktion von Grb2 mit CD28 aktiviert dagegen über den Mitogen-aktivierten Proteinkinase-(MAPK-)Weg unter anderem den Transkriptionsfaktor *activator protein-(AP-)-1*, der ebenfalls an den IL2-Promotor binden kann [zusammengefasst in (12)]. In Abwesenheit eines TZR-Stimulus bindet CD28 nur mit geringer Affinität an CD80/86 und löst keine Zellaktivierung aus [zusammengefasst in (13)].

1.3.3 Ko-Inhibition durch CTLA-4

Um eine Gewebeschädigung infolge einer übermäßigen Aktivierung zu verhindern, verstärken T-Zellen kurz nach Aktivierung die Expression inhibitorischer Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Diese Moleküle verfügen häufig über sog. Immunrezeptor-Tyrosin-basierte inhibierende Motive (ITIM). Analog zum YxxM-Motiv (s. Abschnitt 1.3.2) werden auch ITIMs nach Stimulation phosphoryliert, sodass Proteine mit einer SH2-Domäne binden können. Statt PI3K binden hier jedoch Phosphatasen wie die SH2-Domäne-enthaltende Inositol-Polyphosphat-5-Phosphatase (SHIP) und die SH2-Domäne-enthaltende Phosphatase-1 und -2 (SHP-1 und -2). Diese inhibieren die Signaltransduktion aktivierender Rezeptoren bzw. der TZR-Signalkaskade, indem sie ihre zytoplasmatischen Bindemotive sowie nachgeschaltete Proteine dephosphorylieren. Dies hat die Hemmung von Zellüberleben, Proliferation und Zytokinproduktion zur Folge [zusammengefasst in (14)].

Einer der meist untersuchtesten inhibitorischen Rezeptoren ist *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4). Dieses Protein ist strukturell eng mit CD28 verwandt und bindet ebenfalls an CD80/86, jedoch mit deutlich höherer Affinität (15, 16). In konventionellen T-Zellen ist CTLA-4 in intrazellulären Vesikeln lokalisiert und wird nach TZR/CD28-Stimulation durch Exozytose auf die Zelloberfläche transportiert (17). Nur regulatorische T-Zellen exprimieren CTLA-4 konstitutiv (18). CTLA-4 besitzt kein ITIM, sondern vermittelt seine inhibierenden Effekte über ein Tyr-Val-Lys-Met-(YVKM-)Motiv, welches nach Phosphorylierung die Phosphatasen SHP-2 und Proteinphosphatase 2A (PP2A) binden kann.

Interessanterweise bindet CTLA-4 auch an PI3K, wodurch unter Anergiebedingungen vermutlich das Überleben der Zelle sichergestellt wird [zusammengefasst in (19)]. Neben seiner zell-intrinsischen inhibitorischen Funktion agiert CTLA-4 zudem extrinsisch, indem es CD80- und CD86-Moleküle auf anderen Zellen durch *trans*-Endozytose depletiert, um die Interaktion mit dem ko-stimulierenden Rezeptor CD28 zu verhindern (20). Wie wichtig die CTLA-4-vermittelte Gegenregulation ist, wird im Tiermodell deutlich: Mäuse mit einer CTLA-4-Defizienz entwickelten einen lymphoproliferativen Phänotyp und starben innerhalb von drei bis vier Wochen an Organzerstörungen, die durch eine massive Leukozyteninfiltration verursacht wurden (21, 22).

CTLA-4 fungiert demnach als wichtiger Kontrollpunkt (*Checkpoint*) des Immunsystems und stellt somit auch ein therapeutisches Ziel dar. Beispielsweise ist die Einschränkung der T-Zellaktivierung bei der Immunantwort gegenüber Tumoren von großem Nachteil. Hier können Antikörper, welche die Interaktion von CTLA-4 mit seinen Liganden inhibieren (sog. *Checkpoint*-Inhibitoren), die Funktionslimitierung der T-Zellen aufheben und zu einer verbesserten Tumorkontrolle durch das Immunsystem beitragen. Genau entgegengesetzt wirkt das Fusionsprotein CTLA-4-Ig. Es bindet an CD80/86 und verdrängt das ko-stimulatorische Molekül CD28 aus der Bindung, sodass die Immunantwort bei rheumatoider Arthritis oder Nierentransplantation wirksam abgeschwächt werden kann [zusammengefasst in (23, 24)]. Diese Beispiele verdeutlichen, dass das Ausmaß der T-Zellantwort durch die streng regulierte Balance von Ko-Stimulation und Ko-Inhibition bestimmt wird.

1.3.4 Weitere ko-signalisierende Rezeptoren auf T-Zellen

Neben CD28 und CTLA-4 verfügen T-Zellen über viele weitere Rezeptoren mit ko-stimulatorischer bzw. ko-inhibitorischer Funktion (**Tab. 1-1**). Die meisten Vertreter stammen aus der Immunglobulin-Superfamilie (Ig-SF), zu welcher auch CD28 und CTLA-4 zählen. Weitere Rezeptoren wie OX40, 4-1BB und das Glukokortikoid-induzierte TNFR-verwandte Protein (GITR) stammen aus der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie (TNFR-SF). Im Gegensatz zu Mitgliedern der Ig-SF aktivieren Moleküle der TNFR-SF keine Tyrosinkinasen. Stattdessen binden sie an Adaptorproteine, die TNFR-assoziierte Faktoren (TRAF) rekrutieren und auf diese Weise die Expression der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP-1 und NFAT sowie den MAPK-Weg regulieren [zusammengefasst in (25)].

Obwohl CD28 vermutlich das wichtigste ko-stimulatorische Signal bei der Aktivierung naiver T-Zellen ist, haben Versuche mit CD28-defizienten Mäusen gezeigt, dass die CD28-vermittelte Ko-Stimulation zu einem gewissen Grad durch andere Signale kompensiert werden kann (26). Für die Kompensation kommen nur wenige Rezeptoren in Frage, da die meisten ko-stimulierenden Rezeptoren aktivierungsabhängig, d. h. erst infolge einer vollständigen T-Zell-Aktivierung, exprimiert werden. Zu den aktivierungsunabhängig exprimierten ko-stimulierenden Molekülen zählen CD2 und CD27, wobei es für CD2 Hinweise auf eine CD28-unabhängige T-Zellaktivierung gibt (27, 28).

Tab. 1-1. Ko-signalisierende Rezeptoren der Immunglobulin- und Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie.
Tabelle adaptiert und modifiziert nach (29).

Unterfamilie	Molekül	Art des Signals	Ligand/ Gegenspieler
<i>Immunglobulin-Superfamilie (Ig-SF)</i>			
CD28	CD28	stimulierend	B71, B72, B7H2 (human)
	ICOS (CD278)	stimulierend	B7H2
	CTLA-4 (CD152)	inhibierend	B71, B72, B7H2 (human)
	PD-1 (CD279)	inhibierend	B7H1 (PD-L1), B7DC (PD-L2)
B7	B7.1 (CD80)	inhibierend	B7H1, CD28, CTLA-4
	B7H1 (CD274, PDL1)	inhibierend	PD1, B71
CD226	CD226 (DNAM-1)	Stimulierend	CD112, CD155
	TIGIT	Inhibierend	CD112, CD113, CD155
	CD96 (TACTILE)	Unklar	CD111, CD155
TIM	TIM1	Stimulierend	TIM4, TIM1, PS
	TIM2	Inhibierend	SEMA4A, H-Ferritin
	TIM3	Inhibierend	Galectin-9, Ceacam-1, HMGB-1
CD2/SLAM	CD2 (LFA2, OX34)	Stimulierend	CD48
	SLAM (CD150)	Stimulierend	SLAM
	Ly9 (CD229)	Stimulierend	Ly9
BTN	BTN1	Unbekannt	Unbekannt
	BTN2	Unbekannt	Unbekannt
Orphan	Lag3 (CD223)	Inhibierend	MHC-II und unbekannt
<i>Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie (TNFR-SF)</i>			
Typ-V (divergent)	4-1BB (CD137)	Stimulierend	4-1BBL
	OX40 (CD134)	Stimulierend	OX40L
	CD27 (TNFRSF7)	Stimulierend	CD70
	GITR (CD357)	Stimulierend	GITRL
Typ-L (konventionell)	TNFR1 (CD120a)	Apoptose/Überleben	TNF-β
	HVEM (CD270)	Stimulierend	LIGHT, BTLA, CD160, LTα3, u. a.
	FAS (CD95)	Apoptose	FASL
	CD40 (TNFRSF5)		CD40L
Orphan	RELT	Unklar	Unbekannt
	DR6 (CD358)	Inhibierend	Unbekannt

BTN, Butyrophilin; CTLA-4, *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*; DNAM1, DNAX accessory molecule 1; GITR, *glucocorticoid-induced TNFR-related protein*; HMGB-1, *high mobility group box 1*; HVEM, *herpes virus entry mediator*; ICOS, *inducible T cell costimulatory*; PD-(L)1, *programmed cell death (ligand) 1*; Ig-SF, Immunglobulin-Superfamilie; TACTILE, *T cell-activated increased late expression*; TIGIT, *T-cell immunoglobulin and ITIM domain*; TIM, *T-cell immunoglobulin and mucin domain*; TNFR-SF, *Tumor necrosis factor receptor superfamily*; TNFR1, *Tumor necrosis factor receptor 1*.

Neben CTLA-4 richten sich derzeit für die Krebsimmuntherapie zugelassene *Checkpoint*-Inhibitoren gegen den Rezeptor *programmed cell death protein 1* (PD-1) bzw. seinen Liganden PD-L1 [zusammengefasst in (30)]. Leider spricht nur ein Teil der Patienten optimal auf die Behandlung an, sodass ein großes Interesse an der Modulation weiterer *Checkpoints* mit dem Ziel einer effektiven Kombinationstherapie besteht. In diesem Zusammenhang ist kürzlich die CD226-Unterfamilie der Ig-SF mit ihren Molekülen CD226, TIGIT (DNAM-1) und CD96 in den Fokus der Forschung gerückt.

1.4 Das CD226/TIGIT/CD96-Rezeptornetzwerk

Ähnlich wie CD28 und CTLA-4 binden auch die Rezeptoren CD226, TIGIT und CD96 mit unterschiedlicher Affinität an ihren gemeinsamen Liganden CD155 (Abb. 1-2). Dabei fungiert CD226 als ko-stimulatorischer Rezeptor, während TIGIT die T-Zellaktivierung negativ reguliert. Für CD96 ist die Datenlage nicht eindeutig. Es überwiegen jedoch Hinweise auf eine hemmende Funktion. Alle drei Rezeptoren werden von aktivierten T-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) exprimiert. Der Poliovirus-Rezeptor CD155, für welchen TIGIT die höchste Bindungsaffinität besitzt, wird sowohl von hämatopoetischen (z. B. DC und T-Zellen) als auch von nicht-hämatopoetischen Zellen inklusive Tumorzellen und viral infizierten Zellen exprimiert [zusammengefasst in (31)]. Nachfolgend werden die Rezeptoren mit Schwerpunkt auf CD96 vorgestellt.

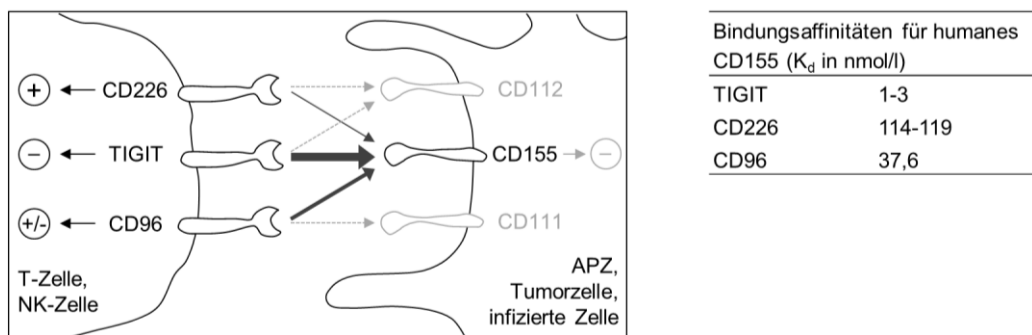


Abb. 1-2. Interaktion von CD226, TIGIT und CD96 mit ihren Liganden. Der Hauptligand für CD226, TIGIT und CD96 ist CD155. Die Pfeildicke repräsentiert die Bindungsaffinität (falls bekannt). Die Interaktion mit weiteren Liganden spielt eine untergeordnete Rolle und ist daher in hellgrau dargestellt. Die Ligation von CD226 übermittelt ein aktivierendes Signal an T- und NK-Zellen, während TIGIT die Signaltransduktion hemmt. Weiterhin hemmt die Bindung von TIGIT und CD155 auch die Ligand-präsentierende Zelle, die nach Ligation weniger IL-12p40 und mehr IL-10 produziert (32). CD112 wird nur mit sehr geringer Affinität von TIGIT gebunden (32), die Affinität von CD226 für CD112 ist unbekannt. Nach Bindung von CD96 an CD155 (und CD111 in der Maus) sind sowohl aktivierende als auch inhibierende Effekte beschrieben. Abbildung und Tabelle modifiziert nach (31). NK-Zelle; natürliche Killerzelle, APZ, antigenpräsentierende Zelle.

1.4.1 Der aktivierende Rezeptor CD226 und der inhibierende Rezeptor TIGIT

CD226 (*DNAX accessory molecule 1*, DNAM-1) wirkt über ein Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes aktivierendes Motiv (ITAM) stimulierend auf die zytotoxischen Funktionen von NK- und CD8⁺ T-Zellen (33). Weiterhin begünstigt es in CD4⁺ T-Zellen die Differenzierung und Proliferation (34) und spielt eine entscheidende Rolle bei der Immunüberwachung, die der Entstehung von Tumoren entgegenwirkt (35-37). Neben CD155 bindet CD226 mit geringer Affinität an einen weiteren Liganden, CD112. Beide Liganden werden ebenso von dem inhibitorischen Rezeptor TIGIT (*T-cell immunoglobulin and ITIM domain*) gebunden. Im Unterschied zu CD226 weist die zytoplasmatische Domäne von TIGIT ein ITIM auf (32, 38). Weiterhin befindet sich in räumlicher Nähe zum diesem Motiv ein *immunoglobulin tail tyrosine*-(ITT)-ähnliches Motiv, das ebenfalls zur Inhibierung beiträgt. Nach Stimulation des Rezeptors wird es an Tyr225 (human) phosphoryliert wodurch die Phosphatase SHP1 rekrutiert wird. Diese wirkt

hemmend auf PI3K sowie den MAPK- und NF- κ B-Signalweg (39). Interessanterweise ist für den aktivierenden Effekt von CD226 ebenfalls ein ITT-Motiv von Bedeutung, wobei nach Phosphorylierung an Tyr319 jedoch PI3K-vermittelte Effektorfunktionen aktiviert werden (40).

Neben der zellintrinsischen Inhibierung trägt die Konkurrenz von TIGIT und CD226 um die Bindung der gemeinsamen Liganden auch indirekt zu einer Zellinhibierung bei. 2014 zeigten Johnston und Kollegen, dass TIGIT sogar direkt mit CD226 interagiert und die Homodimerisierung des ko-stimulierenden Rezeptors verhindert (41). Bis zu diesem Zeitpunkt war nicht bekannt, dass inhibitorische Rezeptoren ihre immunmodulierende Wirkung auch durch physikalische Interaktion vermitteln können (42).

1.4.2 CD96 – ein Molekül mit unklarer Funktion in T-Zellen

1.4.2.1 Struktur und Signaltransduktion

Initial wurde das Molekül CD96 als *T cell-activated increased late expression*, kurz TACTILE, bezeichnet. Die Namensgebung bezieht sich auf das Expressionsmaximum, welches mit sechs bis neun Tagen nach Aktivierung verhältnismäßig spät erreicht ist (43). Im Vergleich zu TIGIT ist die extrazelluläre Domäne von CD96 mit drei Ig-ähnlichen Domänen und einer Stieldomäne, die vermutlich stark glykosyliert ist, relativ komplex.

Über die intrazelluläre Signaltransduktion von CD96 ist nur wenig bekannt. Eine ITIM-ähnliche Domäne (human und murin) deutet auf ein inhibitorisches Signal hin (44). Ob dieses Motiv nach Bindung des Liganden CD155 jedoch tatsächlich phosphoryliert wird, ist nicht bekannt. Zudem besitzt das humane CD96, im Gegensatz zur murinen Variante, ein YxxM-Motiv. Dieses Motiv vermittelt bei CD28 (s. Abschnitt 1.3.2) und ICOS (*inducible T cell costimulator*), einem weiteren Mitglied der CD28-Familie, ein aktivierendes Signal, bei CTLA-4 jedoch ein inhibierendes (s. Abschnitt 1.3.3). Entsprechend wird erst die Identifizierung weiterer Signalmoleküle Aufschluss über die Bedeutung des YxxM-Motivs für die Signaltransduktion des humanen CD96-Moleküls geben. Die Gesamtstruktur von CD96 sowie die Bindung an CD155 sind zwischen Menschen und Mäusen konserviert. Die Aminosäuresequenz stimmt dagegen nur zu 56 % überein. In Mäusen bindet CD96 mit CD111 zudem einen weiteren Liganden (45).

1.4.2.2 Funktion in Zellen mit zytotoxischer Funktion

CD155 zählt wie CD111 und CD112 zur Familie der Nektine und Nektin-ähnlichen Proteine, die eine essenzielle Funktion bei der Ausbildung von Zell-Zell-Verbindungen einnehmen [zusammengefasst (46)]. Demensprechend galt CD96 zunächst als Zelladhäsionsmolekül, welches die Anhaftung von NK- (45, 47) und T-Zellen (45) an ihre CD155-exprimierende Zielzelle vermittelt. Darüber hinaus gibt es in der Literatur kaum Hinweise auf die Bedeutung der CD96-Expression für die Funktion von T-Zellen, obwohl das Molekül schon vor über 25 Jahren als T-Zellaktivierungsantigen beschrieben wurde (43).

Als Anhaltspunkt für die Natur der CD96-vermittelten Immunmodulation können Studien mit NK-Zellen herangezogen werden. Hier ist die Datenlage umfangreicher, aber nicht ganz eindeutig und z. T. inkonsistent zwischen murinen und humanen Studien. Fuchs und Kollegen zeigten, dass CD96 ein *aktivierender* Rezeptor ist und zur verbesserten Lyse von Mastrozytomzellen durch eine humane NK-Zelllinie beitrug (47). Die Zytotoxizität wurde dabei in Gegenwart eines Antikörpers, dessen konstanter Teil von den Tumorzellen gebunden wurde und dessen variabler Abschnitt CD96 auf NK-Zellen stimulierte, überprüft (*redirected killing assay*). Dagegen wurde die Lyse von CD155-exprimierenden humanen Ovarialkarzinom- (48) und Myelomzellen (49) durch eine Blockade der CD96 – CD155 Interaktion nicht beeinflusst. Auch NK-Zellen aus CD96^{-/-} Mäusen und anti-CD96 behandelte wildtypische NK-Zellen konnten verschiedene Tumorzelllinien nicht effizienter lysieren (50).

Neben der Ausschüttung lytischer Granula sind NK-Zellen jedoch auch zur Produktion von Zytokinen und Chemokinen fähig und besitzen damit eine weitere bedeutsame Effektorfunktion. Chan und Kollegen zeigten 2014, dass die Bindung von CD96 an CD155 die Interferon-(IFN-) γ -Produktion in NK-Zellen *negativ regulierte* (50). Dementsprechend zeigten CD96^{-/-} Mäuse nach Aktivierung eine hyperinflammatorische Immunantwort und waren dadurch in einem chemisch induzierten Tumormodell besser vor der Tumorentstehung geschützt. Außerdem zeigte die Studie, dass CD96 mit dem aktivierenden Rezeptor CD226 um die Bindung an CD155 konkurriert. Demnach erstreckt sich der regulierende Einfluss von CD96 in NK-Zellen vermutlich weniger auf die Tumorlyse und vielmehr auf die Zytokinproduktion. Die negative Korrelation zwischen der Expression von CD96 und der Produktion von Effektormolekülen wurde in einer Studie mit zytotoxischen T-Zellen bestätigt. Eriksson *et al.* beobachteten, dass CD8⁺CD96^{neg} T-Zellen aus Probanden, die mit dem humanen Immundefizienz-Virus 1 (HIV1) infiziert waren, sowohl IFN- γ als auch Perforin produzierten, während CD8⁺CD96⁺ T-Zellen lediglich IFN- γ produzierten (51).

Abgesehen von diesen Daten aus Zellen mit zytotoxischen Effektorfunktionen gibt es keine Hinweise auf die Funktion von CD96 in CD4⁺ T-Zellen. Damit ist die Bedeutung von CD96 als ko-signalisierendes Molekül im Unterschied zu TIGIT und CD226 derzeit nicht bekannt (52).

1.5 Die Diversität der CD4⁺ T-Helferzellen

Aktivierte CD4⁺ T-Helfer-(Th-)zellen kontrollieren die Immunantwort gegenüber zahlreichen Erregerklassen (z. B. intra- versus extrazellulär). Die Ausbildung einer adäquaten Immunantwort beruht dabei auf der Existenz funktionell spezialisierter Subgruppen. Ausschlaggebend für die Differenzierung ist das lokale Zytokinmilieu, welches stark von der APZ bestimmt wird (Signal 3, vgl. Abb. 1-1). Die Natur des Antigens beeinflusst diesen Prozess ebenfalls.

Schon in den späten 1970er Jahren gab es erste Hinweise auf die Diversität von CD4⁺ (damals L3T4⁺Lyt2^{neg}, CD4⁺CD8^{neg}) Zellen, die offenbar unterschiedliche Hilfe für die Bildung einer Antikörperantwort liefern konnten (53). Der zugrundeliegende Mechanismus wurde 1986 aufgedeckt, als Mosmann und Coffman zwei murine Th-Zellklone identifizierten, die sich aufgrund ihrer divergenten Lymphokinausschüttung in ihrer biologischen Aktivität unterschieden. Sie definierten Th1-Zellen als Produzenten von IL-2, IFN- γ und Lymphotoxin, während Th2-Zellen *B cell stimulatory factor 1* (BSF1, heute bekannt als IL-4) und *mast cell growth factor-2* (MCGF2, IL-5) produzierten (54). Bedingt durch die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine können Th1-Zellen Makrophagen, CD8⁺ zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen aktivieren und die Abwehr intrazellulärer Erreger vermitteln. Th2-Zellen regen dagegen die Antikörperproduktion durch B-Zellen an und schützen so vor extrazellulären Pathogenen. Die Differenzierung ist darüber hinaus mit der Ausbildung eines distinkten Proteinmusters auf der Zelloberfläche verbunden und wird durch spezifische, kreuzregulierte Transkriptionsfaktoren (sog. Master-Regulatoren) kontrolliert. Inzwischen wurde die Th1/Th2-Dichotomie um zusätzliche Subgruppen erweitert (**Abb. 1-3**). Außerdem ist bekannt, dass die Differenzierung kein irreversibler Prozess ist, sondern einer gewissen Plastizität unterliegt [zusammengefasst in (55)].

Th17-Zellen sind durch die Produktion von IL-17A, IL-17F und IL-22 charakterisiert. Sie rekrutieren neutrophile Granulozyten sowie Makrophagen und dominieren die Immunantwort bei Infektionen mit einigen extrazellulären grampositiven (z. B. *Propionibacterium acnes*) sowie gramnegativen (z. B. *Citrobacter rodentium*, *Bacteroides* spp.) Bakterien und bei systemischen Pilzinfektionen (z. B. *Candida albicans*). Allerdings spielen sie auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung autoimmuner Entzündungsreaktionen [zusammengefasst in (56)].

Im Unterschied zu den pro-inflammatorischen Th17-Zellen wirken *Forkhead-Box-Protein 3* (Foxp3)-exprimierende **regulatorische T-(Treg-)Zellen** supprimierend auf die Immunantwort. Die meisten Treg-Zellen entstehen im Thymus und werden daher als tTreg-Zellen bezeichnet. Sie können jedoch auch in peripheren Geweben in Anwesenheit von *transforming growth factor*-(TGF)- β aus Foxp3^{neg} konventionellen T-Zellen hervorgehen (pTreg-Zellen). *In vitro* induzierte regulatorische T-Zellen werden als iTreg-Zellen bezeichnet. Treg-Zellen hemmen Immunreaktionen über verschiedene Mechanismen, z. B. indem sie anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10, IL-35 und TGF- β ausschütten [zusammengefasst in (57)].

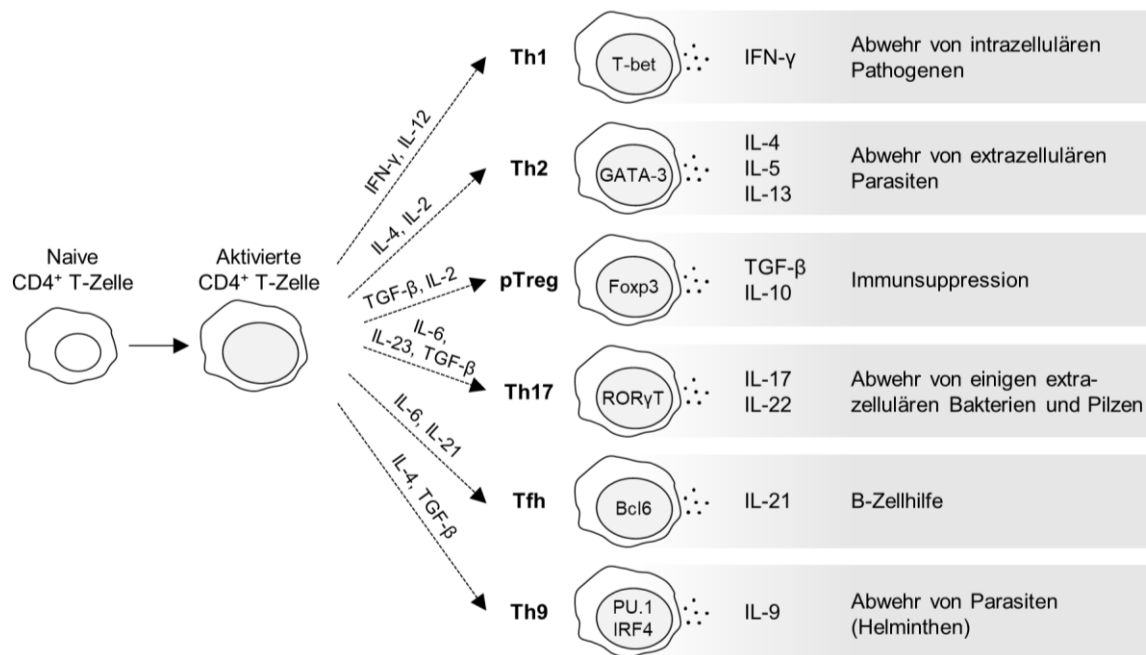


Abb. 1-3. In vitro Differenzierung von CD4⁺ T-Helferzellen. Aktivierte T-Zellen können abhängig vom lokalen Zytokinmilieu (gestrichelte Pfeile) in verschiedene Th-Zellen differenzieren, die sich durch die Expression spezifischer Master-Regulatoren (s. Beschriftung des Zellkerns) und Zytokine sowie vermittelter Effekte unterscheiden. Weitere Informationen sind bitte dem Haupttext zu entnehmen. Schema adaptiert und modifiziert nach (58). Th-Zelle, T-Helferzelle.

Follikuläre Th-(Tfh)-Zellen initiieren die Ausbildung der Keimzentren und liefern damit essenzielle Hilfe für B-Zellen. Weiterhin spielen sie eine fundamentale Rolle bei der Affinitätsreifung der Antikörper, indem sie hoch-affinere B-Zellen positiv selektieren. Sie sind durch die Expression von CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 5 (CXCR5) charakterisiert und produzieren IL-21. Seit der Identifizierung des spezifischen Master-Regulators *B cell CLL/lymphoma 6* (Bcl6) gelten sie als eigenständige Th-Subgruppe [zusammengefasst in (59)].

Th9-Zellen sind die jüngste Ergänzung zur Liste der Th-Subgruppen. Sie sind durch die Produktion großer Mengen IL-9 charakterisiert und werden nachfolgend detaillierter vorgestellt.

1.5.1 Th9-Zellen

Th9-Zellen wurden erstmals 1994 beschrieben und zunächst nicht als eigenständige Subgruppe betrachtet. Damals beobachteten Schmitt *et al.*, dass sich die IL-2-abhängige IL-9-Produktion in murinen CD4⁺ T-Zellen beträchtlich durch die Zugabe von IL-4 und TGF- β steigern ließ (60). Zu jenem Zeitpunkt galt IL-9 als klassisches Th2-Zytokin. Ursächlich für diese Zuordnung war die Beobachtung, dass aus *Leishmania major*-infizierten BALB/c Mäusen, die bekanntermaßen zur Ausbildung einer Th2-Antwort neigen, IL-9-produzierende T-Zellen isoliert werden konnten (61).

14 Jahre später stellten zwei Gruppen unabhängig voneinander fest, dass die in Gegenwart von IL-4 und TGF- β differenzierten Zellen weder den Th2-assoziierten Transkriptionsfaktor

GATA binding protein-3 (GATA-3) noch andere Th-spezifische Transkriptionsfaktoren exprimierten. Auch eine Ko-Produktion von klassischen Th1-, Th2- und Th17-assoziierten Zytokinen konnte nicht beobachtet werden (62, 63). Aus diesem Grund diskutierten die Autoren die Entdeckung einer neuen Th-Subgruppe, die sie in Anlehnung an das vorrangig produzierte Zytokin „Th9“-Zellen nannten.

1.5.1.1 Differenzierung und transkriptionelles Netzwerk

Für die Differenzierung muriner und humaner Th9-Zellen ist die Anwesenheit von IL-4 und TGF- β erforderlich. Während das TGF- β -Signal unerlässlich ist, kann IL-4 partiell durch IL-1 α , IL-1 β , IL-18 bzw. IL-33 substituiert werden (64). *In vitro* können Th9-Zellen durch die Aktivierung von naiven CD4⁺ T-Zellen und durch Umprogrammierung bereits differenzierter Th-Zellen generiert werden. Veldhoen *et al.* berichteten, dass die Kultivierung von murinen Th2-Zellen in Gegenwart von TGF- β eine verminderte GATA-3-Expression und den Verlust ihres klassischen Zytokinprofils verursachte (62). Die Zellen produzierten stattdessen große Mengen IL-9 und IL-10, wobei das zuletzt genannte als Th2-Relikt gewertet wurde. In humanen Th9-Zellen konnte die Produktion von IL-10 dagegen nicht nachgewiesen werden (65). Darüber hinaus ist bekannt, dass murine und humane Th9 Zellen IL-21 produzieren (66, 67). Neuere Daten zeigen außerdem, dass auch Treg-Zellen durch Stimulation mit anti-GITR in einen Th9-Phänotyp konvertieren (68, 69). Ähnliche Beobachtungen wurden für Th17-Zellen in Gegenwart von IL-2, IL-4 und TGF- β beschrieben [zusammengefasst in (70)].

PU.1 und der Interferon-regulierende Faktor 4 (IRF4) waren die ersten Transkriptionsfaktoren, die mit der Th9-Differenzierung assoziiert wurden (71, 72). PU.1 ist ein Mitglied der *E-Twenty-Six*-(ETS-)Familie und wird durch das Gen *Spi1* kodiert. PU.1 bindet direkt an den *Il9*-Promotor und erhöht durch Rekrutierung der Histonacetyltransferase Gcn5 die Histonacetylierung (73) und infolgedessen die Dekondensierung des Chromatins (71, 74). Entsprechend führte der Verlust von PU.1 zu einer verminderten IL-9-Produktion (71). Genau wie PU.1 bindet auch IRF4 direkt an den *Il9*-Promotor, wobei die Abwesenheit von IRF4 die Th9-Differenzierung fast vollständig unterband (72). Inzwischen wurde mit *basic leucine zipper ATF-like transcription factor* (BATF) ein weiterer Transkriptionsfaktor mit essenzieller Bedeutung für die Th9-Differenzierung identifiziert (75). Obwohl alle drei Faktoren starke Aktivatoren der *Il9*-Expression sind, agiert keiner von ihnen als Th9-Master-Regulator. PU.1 spielt beispielsweise auch eine Rolle bei der B-Zellentwicklung (76), während IRF4 von allen bekannten Th-Subgruppen exprimiert wird (77). Die Ausbildung des Th9-Phänotyps ist vielmehr das Ergebnis der gegenseitigen Inhibierung verschiedener Transkriptionsfaktoren (Abb. 1-4).

Im Wesentlichen initiiert die Stimulation des IL-4-Rezeptors *signal transducer and activator of transcription*-(STAT)-6-abhängig die Expression von GATA-3, BATF und IRF4. IRF4 wird STAT5-abhängig durch das Signal des IL-2-Rezeptors amplifiziert. Durch das TGF- β -Signal werden dagegen PU.1, Foxp3 und die Smad-Proteine 2, 3 und 4 aktiviert. Die Aktivität von Foxp3 (Treg-Differenzierung) wird durch das STAT6-Signal gehemmt, während PU.1 die Expression von GATA-3 (Th2-Differenzierung) senkt. Es ist zu erwähnen, dass Th9-Zellen im Vergleich zu Th2-Zellen zwar deutlich weniger *Gata3*-mRNA, jedoch vergleichbare

Proteinmengen exprimierten (62, 78). Entsprechend führte die Deletion von *Gata3* ebenfalls zu einer Beeinträchtigung der Th9-Differenzierung *in vitro* (63), während eine moderate Überexpression die Differenzierung in Th2-Zellen auslöste (78). Diese Daten unterstreichen nicht nur die enge Verwandtschaft von Th2 und Th9-Zellen, sondern auch die Bedeutung der fein regulierten Balance der Transkriptionsfaktoren für die Ausbildung des Th9-Phänotyps.

Die Transkriptionsfaktoren PU.1, BATF, IRF4 und GATA-3 binden zusammen mit weiteren Faktoren wie NF- κ B und NFAT an den *IL9*-Promotor und induzieren die Transkription von *IL9*. Obwohl die Kombination aus IL-2, IL-4 und TGF- β für die Th9-Differenzierung ausreichend ist, kann die IL-9-Produktion durch verschiedene Signalwege verstärkt werden. Beispielsweise aktivieren akzessorische Zytokine wie IL-1, IL-25 und IL-33 zusätzlich den NF- κ B-Signalweg, während α - und β -Interferone sowie IL-1 α/β über STAT1 die Expression von IRF1 induzieren. Auch die Interaktion mit ko-stimulatorischen Molekülen auf den APZ verstärkt die *IL9*-Expression, hauptsächlich durch die Aktivierung von NF- κ B (41BB, OX40) und NFAT (CD28) [zusammengefasst in (79)].

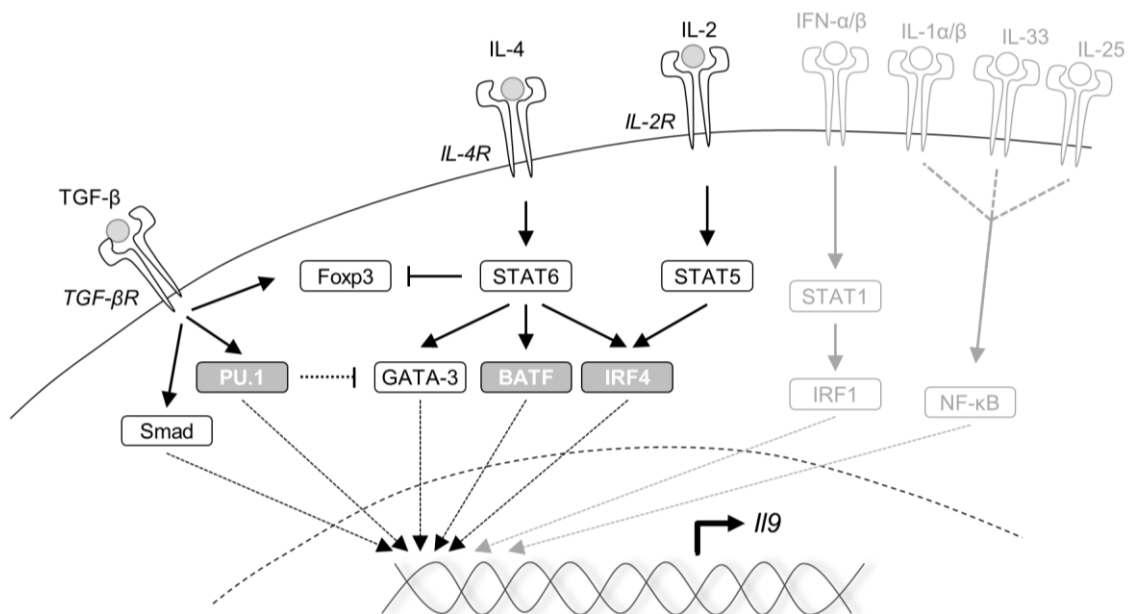


Abb. 1-4. Transkriptionelle Kontrolle des *IL9*-Promotors in Th9-Zellen. Die Bindung von IL-4 an den IL-4-Rezeptor (IL-4R) induziert STAT6-abhängig die Expression der Transkriptionsfaktoren GATA-3, BATF und IRF4. Die Expression von IRF4 wird STAT5-abhängig durch IL-2 verstärkt. Die Stimulation des TGF- β -Rezeptors (TGF- β R) führt zur Induktion von Foxp3, PU.1 und Smad. Die Ausbildung eines Foxp3⁺ Treg-Phänotyps wird von STAT6 gehemmt, während PU.1 die Entstehung von GATA-3⁺ Th2-Zellen inhibiert. PU.1, BATF, IRF4 und GATA-3 binden an den *IL9*-Promotor, dessen Aktivität durch die IFN- α/β -, IL-1 α/β -, IL-33- und IL-25-vermittelte Signaltransduktion verstärkt werden kann. TGF- β , transforming growth factor- β ; STAT, signal transducer and activator of transcription; GATA-3, GATA binding protein 3; BATF, basic leucine zipper ATF-like transcription factor; IRF, Interferon Regulatory Factor; NF- κ B, nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells; Foxp3, Forkhead-Box-Protein 3; IFN, Interferon.

1.5.1.2 IL-9 – ein Th9-Zytokin?

IL-9 wurde zunächst als T-Zellwachstumsfaktor identifiziert und zählt zusammen mit IL-2, IL-4, IL-7, IL-15 und IL-21 zur *common γ -chain-receptor*-Zytokinfamilie. Allen Familienmitgliedern ist die Bindung an heterodimere Rezeptoren bestehend aus einer ligandspezifischen α -Kette und einer gemeinsam genutzten γ -Kette sowie die Aktivierung des Januskinase-(JAK)-STAT-Signalwegs gemein. Die Bindung von IL-9 induziert eine Konformationsänderung des IL-9-Rezeptors wodurch die Rezeptor-gekoppelten Tyrosinkinasen JAK1 und JAK3 aktiviert werden und sich selbst phosphorylieren. Anschließend phosphorylieren sie den Rezeptor und ermöglichen damit die Bindung von STAT1, STAT3 und STAT5 über ihre SH2-Domäne. Nachdem auch die STAT-Proteine durch JAK1/3 phosphoryliert wurden, wandern sie als Dimere in den Zellkern, wo sie die Transkription IL-9-regulierter Gene initiieren [zusammengefasst in (80)].

Obwohl Th9-Zellen auf die Produktion großer Mengen IL-9 spezialisiert sind, ist die Expression des Zytokins auch für anderen Zelltypen belegt. Innerhalb der CD4⁺ Th-Zellen existieren Berichte über IL-9-produzierende Th2- (81) Th17- (71, 82, 83) und Treg-Zellen (84, 85), wobei im Vergleich zu Th9-Kulturen deutlich geringere IL-9-Mengen detektiert wurden. Außerdem muss erwähnt werden, dass für alle genannten Th-Subgruppen die Konvertierung in Th9-Zellen beschrieben ist (s. Kapitel 1.5.1.1). Entsprechend ist zu klären, ob es sich bei IL-9⁺IL-17⁺ Zellen um IL-9-produzierende Th17-Zellen oder IL-17⁺ Th9-Zellen handelt.

Genau wie CD4⁺ Th-Zellen differenzieren auch CD8⁺ T-Zellen in verschiedene Subgruppen und können ebenfalls einen IL-9-produzierenden Phänotyp ausbilden (86). Diese Zellen werden als Tc9-Zellen bezeichnet und exprimieren im Gegensatz zu zytotoxischen Tc1-Zellen nur geringe Mengen Granzym B und Perforin (87). Neben T-Zellen können auch angeborene lymphoide Zellen (*innate lymphoid cell*, ILC) vom Typ 2 z. B. bei einer Allergen-induzierten Entzündung der Lunge (88) oder im Kontext einer parasitären Helmintheninfektion (89) größere Mengen IL-9 produzieren. Ferner sezernieren natürliche Killer-T-(NKT-)Zellen (90, 91), aktivierte Mastzellen (92, 93) und eosinophile Granulozyten (94) moderate Mengen IL-9. Zusammenfassend besitzen verschiedene Zelltypen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems die Fähigkeit zur IL-9-Produktion, wobei Th9- und ILC2-Zellen gegenwärtig als die potentesten IL-9-Produzenten angenommen werden (79, 95).

1.5.1.3 Bedeutung für das Immunsystem

IL-9 ist ein pleiotropes Zytokin mit direkter und indirekter Wirkung auf unterschiedliche Zelltypen. Entsprechend ist der IL-9-Rezeptor weit verbreitet und wird unter anderem von T-Zellen, Mastzellen, polymorphnukleären Leukozyten (neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten), APZ und Epithelzellen exprimiert. IL-9 ist primär ein Wachstumsfaktor für T- und Mastzellen und fördert in Mastzellen die Produktion von Zytokinen wie IL-1 β , IL-5, IL-6 und TGF- β . Weiterhin verstärkt IL-9 die IL-4-vermittelte Produktion von IgE und IgG durch Plasmazellen und steht daher in direktem Zusammenhang mit der Entstehung atopischer Erkrankungen [zusammengefasst in (80, 96)].

Obwohl in murinen Th9-Zellen die Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 beobachtet wurde (62, 63, 71), scheinen Th9-Zellen überwiegend pro-inflammatorische Effekte zu vermitteln. Veldhoen *et al.* berichteten bei ihrer Erstbeschreibung eine Beteiligung von Th9-Zellen an der **Abwehr gastrointestinaler Wurminfektionen** (62). Hier zeigten Mäuse mit einer TGF- β -Rezeptor-Defizienz in CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu wildtypischen Mäusen eine verminderte IL-9-Produktion sowie eine höhere Last mit dem Nematoden *Trichuris muris* und weniger Mastzellen am Infektionsort. Auch in anderen Infektionsmodellen war eine signifikante Reduktion der Wurmlast eindeutig mit der Anwesenheit von Th9-Zellen und der Rekrutierung von Mastzellen oder basophilen Granulozyten verknüpft (89, 97). Zudem wurde in Menschen mit lymphatischer Filariose (Elephantiasis) (81) und *Strongyloidis stercoralis*-Infektion eine erhöhte Anzahl zirkulierender parasitspezifischer IL-9⁺IL-4^{neg} Th9-Zellen beobachtet (98).

Bedingt durch seine Eigenschaft als Zellwachstumsfaktor ist IL-9 u. a. mit der Entstehung hämatologischer Krebserkrankungen wie dem Hodgkin-Lymphom assoziiert. Interessanterweise besitzen Th9-Zellen gegenüber soliden Tumoren und insbesondere malignen Melanomen jedoch eine **anti-tumorale Wirkung** [zusammengefasst in (99)]. Purwar *et al.* transferierten *in vitro* differenzierte Th9-Zellen in Mäuse, denen subkutan B16-F10-Melanomzellen injiziert wurden und beobachteten ein deutlich vermindertes Tumorstadium verglichen mit dem Transfer von Th1- oder Th17-Zellen. Die Neutralisierung von IL-9 hob die protektive Wirkung der Th9-Zellen auf (100). Diese Resultate wurden in nachfolgenden Studien bestätigt (67, 101) und auf weitere Tumormodelle wie das pulmonale Adenokarzinom (67) ausgeweitet. Der schützende Effekt von Th9-Zellen begründet sich vorwiegend in der Rekrutierung von Zellen mit direkter anti-tumoraler Aktivität wie Mastzellen, zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen [zusammengefasst in (99)]. Weiterhin wurde gezeigt, dass Th9-Zellen CC-Chemokinligand 20-(CCL20)-abhängig dendritische Zellen in das Tumorgewebe rekrutieren können und so die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen verstärken können (101). Eine andere Studie deutete an, dass die Th9-vermittelte Tumorstimmung auch auf ihre Fähigkeit zur IL-21-Produktion zurückzuführen ist, da die Produktion von IFN- γ durch CD8⁺ T- und NK-Zellen IL-21-abhängig stieg (67). Zusätzlich zu den beschriebenen indirekten Effekten existiert ein einzelner Bericht über eine direkte Abtötung von B16-F10-Tumorzellen durch Th9-Zellen *in vitro* (100).

Neben ihrer protektiven Rolle bei Wurminfektionen und gegenüber malignen Tumoren sind Th9-Zellen jedoch auch an der **Pathogenese atopischer Erkrankungen** beteiligt. Gene, die an der Ausbildung und der Funktion von Th9-Zellen beteiligt sind (z. B. *STAT6*, *IL9*, *IL9R*, *SMAD3* und *IL33*), wurden in verschiedenen Studien mit Asthmatikern und Lebensmittelallergikern assoziiert [zusammengefasst in (79)]. Zudem unterschieden sich Allergiker von gesunden Kontrollpersonen durch eine erhöhte Anzahl zirkulierender Th9-Zellen (102, 103). IL-9-produzierende Th9-Zellen aus atopischen Patienten exprimierten u. a. den Th9-assoziierten Transkriptionsfaktor *IRF4*, während das Th2-assoziierte Zytokin *IL5* nicht detektiert wurde (103). Im Tiermodell zeigte sich, dass der Transfer von Th9-Zellen mit der Akkumulation von Mastzellen und eosinophilen Granulozyten, einer verstärkten Produktion von Mukus und Th2-assoziierten Zytokinen sowie bronchialer Hyperaktivität assoziiert war. Eine Neutralisation von

IL-9 oder der Transfer IL-9-defizienter Th9-Zellen milderte die Symptome signifikant ab bzw. verhinderte ihre Entstehung [zusammengefasst in (79)]

Darüber hinaus wurden Th9-Zellen kürzlich mit der **Ausbildung chronisch entzündlicher Darmerkrankung** in Verbindung gebracht. Da sie gegenwärtig sogar als Auslöser diskutiert werden, könnte die Modulierung der Th9-Differenzierung die Basis für ein neues Therapiekonzept sein. Ferner gibt es Hinweise auf eine Rolle von Th9-Zellen bei der **Abstoßung allogener Transplantate**, die bislang jedoch kaum untersucht wurde. In den folgenden Abschnitten wird die Bedeutung IL-9-produzierender Th-Zellen für beide Immunreaktionen ausführlicher vorgestellt.

a. Pro-inflammatorische Rolle von Th9-Zellen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Als chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) werden rezidivierende oder kontinuierlich fortschreitende Entzündungen des Gastrointestinaltraktes bezeichnet. Es handelt sich dabei um multifaktorielle Erkrankungen, deren Ursache in einer Kombination aus genetischer Prädisposition, Risiko- und Umweltfaktoren sowie einer Störung der Darmbarrierefunktion gesehen wird. Der pathophysiologische Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt, aber es gilt gegenwärtig als gesichert, dass der Barrieredefekt eine zentrale Rolle spielt. Infolgedessen können Bakterien der kommensalen Darmflora und Lebensmittelantigene in die Mukosa eindringen. Die Aufnahme und Antigenpräsentation in den lokalen Lymphknoten führt zur Aktivierung von T-Zellen, die über das Integrin $\alpha 4\beta 7$ und den C-C-Motiv-Chemokinrezeptor 9 (CCR9) wieder in die Mukosa einwandern. Dort initiieren sie durch Ausschüttung großer Mengen pro-inflammatorischer Zytokine eine Schädigung des Gewebes. Zusätzlich wird auf diese Weise die genau abgestimmte Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Signalen im Darm aus dem Gleichgewicht gebracht, sodass die Entzündung aufrechterhalten wird und chronifiziert [zusammengefasst in (104, 105)].

Die beiden häufigsten CED-Entitäten sind Morbus Crohn (*Crohn's disease*, CD) und Colitis ulcerosa (*ulcerative colitis*, UC), die sich unter anderem in ihrem Befallmuster unterscheiden. Während CD diskontinuierlich den gesamten Verdauungstrakt betreffen kann, ist die Entzündung bei UC auf das Kolon beschränkt und breitet sich kontinuierlich von anal nach oral aus. Beide Erkrankungen verlaufen schubweise und äußern sich durch (blutigen) Durchfall, Bauchschmerzen und Gewichtsverlust. Die Prävalenz von UC in Deutschland liegt bei ca. 180 Betroffenen pro 100 000 Einwohnern (Quelle: S3-Leitlinie 021/009, Stand 2018) und ist vergleichbar zur CD-Prävalenz mit 100 bis 200 Betroffenen pro 100 000 Einwohnern (Quelle: S3-Leitlinie 021/004, Stand 2014).

Die primären Mediatoren bei CD sind IL-12, IFN- γ und Tumornekrosefaktor-(TNF-) α – man spricht von einer Th1-dominierten Immunantwort. In der Mukosa von UC-Patienten dominieren dagegen Th2-assoziierte Zytokine wie IL-5 und IL-13. Gegenüber gesunden Kontrollpersonen wurden darüber hinaus in beiden Krankheitsbildern mehr Th17-Zellen und weniger Treg-Zellen beobachtet [zusammengefasst in (105)]. Interessanterweise wurde zudem

kürzlich gezeigt, dass die Frequenz an $CD4^+PU.1^+$ Zellen im Gastrointestinaltrakt von CD- und UC-Patienten signifikant gegenüber gesunden Probanden oder Patienten in Remission erhöht war (106). Obwohl dieser Befund in beiden Entitäten auf die Anwesenheit von Th9-Zellen hindeutete, waren die Zellen nur in UC-Patienten mit der Produktion von IL-9 assoziiert (106, 107). Ko-Färbungen zeigten, dass die IL-9-Produktion hauptsächlich auf mukosale T-Zellen zurückzuführen war (106, 107). Weiterhin korrelierten die IL-9-Expression sowie die Frequenz der IL-9⁺ (T-) Zellen positiv mit dem Schweregrad der Erkrankung (106, 107). In Übereinstimmung damit wurde eine erhöhte Expression des Th9-fördernden Zytokins IL-33 (108, 109) und des IL-9-Rezeptors (106, 107) in UC-Patienten nachgewiesen. Bei experimenteller Oxazolon-induzierter UC war die Abwesenheit von IL-9 mit einer signifikanten Verbesserung klinischer Parameter wie Körpergewicht und Entzündung verbunden (106).

Über den Pathomechanismus ist bisher bekannt, dass die Expression des IL-9-Rezeptors auf intestinalen Epithelzellen in UC-Patienten erhöht ist (106). Untersuchungen in Organoiden (dreidimensionale Zellkultursysteme) aus intestinalen Krypten belegten einen hemmenden Einfluss von IL-9 auf die Proliferation von Epithelzellen. Zudem interferierte IL-9 negativ mit der mukosalen Wundheilung (106, 107). Eine verstärkte Apoptose von Epithelzellen wurde dagegen nicht beobachtet. Ferner wurde eine selektive Regulation kanal- und barrierebildender *tight junction*-Proteine durch IL-9 beobachtet (106, 110). So zeigten Patienten mit aktiver UC und Mäuse mit experimenteller Kolitis in Anwesenheit von IL-9 eine höhere Expression des kanalbildenden Proteins Claudin-2, während die Expression der barrierebildenden Faktoren Claudin-3 und Occludin vermindert war (106). Diese Daten demonstrieren, dass Epithelzellen in UC ein primäres Ziel von Th9-Zellen sind und IL-9 kritisch mit einer intakten Darmbarriere interferiert (Abb. 1-5).

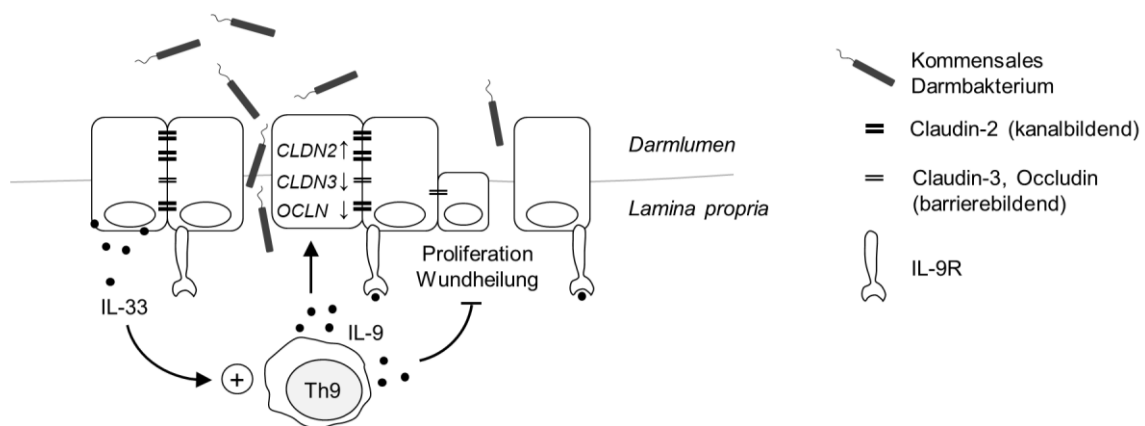


Abb. 1-5. Die Rolle von Th9-Zellen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Die Ausschüttung von IL-9 durch Th9-Zellen hemmt die Proliferation intestinaler Epithelzellen und die Wundheilung. Weiterhin verursacht IL-9 in intestinalen Epithelzellen eine gesteigerte Expression des kanalbildenden *tight junction*-Proteins Claudin-2, während die Expression der barrierebildenden Faktoren Claudin-3 und Occludin durch IL-9 reduziert wird. Infolgedessen können kommensale Darmbakterien und Lebensmittelantigene aus dem Darmlumen in die Lamina propria einwandern. Die gesteigerte IL-33-Produktion durch Epithelzellen bei UC amplifiziert die Sekretion von IL-9 durch Th9-Zellen. CLDN, Claudin; OCLN, Occludin, IL-9R, IL-9-Rezeptor.

b. Anti-inflammatorische Rolle von Th9-Zellen bei der Transplantatabstoßung

Die akute Abstoßung eines allogenen Transplantates, d. h. von Gewebe eines genetisch nicht-identischen Individuums derselben Spezies, ist das Ergebnis einer starken T-Zellantwort des Empfängers gegen die hoch-polymorphen MHC-Peptid-Komplexe des Spenders. Hierbei kommt den APZ des Spenders, die als „Passagier-Leukozyten“ zusammen mit dem Transplantat übertragen werden, eine große Bedeutung zu. Sie reifen aufgrund der pro-inflammatorischen Wirkung der Operation und migrieren in die lokalen Lymphknoten des Empfängers. Dort präsentieren sie ihre intakten Allo-MHC-Klasse-I und -II-Peptid-Komplexe direkt allo-reaktiven CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, die ca. 7 % (111) des T-Zellpools ausmachen. Warum die Frequenz von T-Zellen mit direkter Allo-Spezifität trotz MHC-Selbst-Restriktion derart hoch ist, ist nicht eindeutig geklärt. Neben der direkten Fremderkennung trägt auch die indirekte Erkennung von Allo-Antigenen, die durch APZ des Empfängers prozessiert und im Kontext von Selbst-MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden, zur Abstoßung bei [zusammengefasst in (112)].

Viele Studien belegen, dass die akute Transplantatabstoßung typischerweise mit der Ausbildung einer Th1-Antwort assoziiert ist. Infolge der Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine wie IFN- γ und TNF- α werden Monozyten bzw. Makrophagen rekrutiert und vermitteln eine Hypersensibilitätsreaktion vom verzögerten Typ. Zeitgleich produzieren Th1-Zellen IL-2 und fördern damit die Proliferation allo-reaktiver CD8⁺ T-Zellen. Insbesondere in Abwesenheit einer Th1-Antwort, z. B. bei einer Behandlung mit Calcineurin-Inhibitoren, sind zudem Th2- und Th17-Antworten relevant für die Initiierung einer Abstoßungsreaktion. Dagegen sind allo-reaktive Treg-Zellen eindeutig mit der Toleranz allogener Transplantate assoziiert [zusammengefasst in (113, 114)].

Der Einfluss von Th9-Zellen auf die Abstoßung wurde bisher nur in wenigen Studien untersucht. Zwei Studien deuten an, dass Th9-Zellen eine Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (*graft-versus-host disease*, GvHD) infolge einer allogenen Knochenmarktransplantation durch Unterdrückung der IFN- γ -Produktion abmildern können (115, 116). Für allogene transplantierte Organe wie Haut oder Herz wurden bisher keine Versuche mit adoptiv transferierten Th9-Zellen durchgeführt. Allerdings geht die Produktion von IL-9, die in einer Studie von Lu und Kollegen aus dem Jahr 2006 mit der Toleranz von Hauttransplantaten in Verbindung gebracht wurde (84), sehr wahrscheinlich auf Th9-Zellen zurück. Zu jenem Zeitpunkt waren Th9-Zellen noch nicht als eigenständige Subgruppe beschrieben. Aufgrund der Expression von CD4 und CD25 wurde die IL-9-Produktion stattdessen Treg-Zellen zugeschrieben. Zudem beobachteten Lu *et al.* in diesen Zellen insbesondere nach GITR-Stimulation eine hohe Expression von IL-9. Inzwischen wurde nicht nur gezeigt, dass Foxp3 ein starker Inhibitor der IL-9-Expression ist, sondern auch, dass die Stimulation mit anti-GITR die Differenzierung von iTreg-Zellen unterbindet und stattdessen Th9-Zellen mit anti-tumoraler Wirkung induziert (68, 69). Daher kann in der Studie von Lu *et al.* die Anwesenheit von Th9-Zellen und folglich eine Toleranz-vermittelnde Wirkung von Th9-Zellen angenommen werden.

Im Gegensatz zu diesen anti-inflammatorischen Effekten erwähnten Poulin und Kollegen IL-9 im Kontext einer *verstärkten* Abstoßungsreaktion (117). Hier war eine Th2-dominierte Immunantwort bei Mäusen nach allogener Herztransplantation mit einer Akkumulation von *IL9*-mRNA assoziiert. Ferner wurden in der Studie Herztransplantate aus IL-9-überexprimierenden Spendertieren unter anderem durch eosinophile Granulozyten abgestoßen, während Transplantate aus Wildtyp-Kontrolltieren in diesem speziellen MHC-I-unabhängigen Modell keine Abstoßung entwickelten. Allerdings liefert diese Studie keinen konkreten Anhaltspunkt für eine Beteiligung von Th9-Zellen, da der zelluläre Ursprung des Zytokins nicht untersucht wurde. Abschnitt 1.5.1.2 gibt einen Überblick über potenzielle IL-9-Produzenten.

1.6 Zielsetzung

Die anti-inflammatorischen Effekte von Th9-Zellen im Rahmen einer allogenen Immunantwort nach Transplantation stehen im Widerspruch zu ihrer entzündungsfördernden Wirkung z. B. bei atopischen oder chronisch-entzündlichen Erkrankungen (s. Abschnitt 1.5.1.3). Diese gegensätzlichen Eigenschaften deuten auf eine bisher nicht näher untersuchte funktionelle Heterogenität in Th9-Zellen hin. Darüber hinaus ist die Rolle von Th9-Zellen abgesehen von einigen Hinweisen aus Studien mit allogenen Zelltransplantaten bei der Abstoßung von Organen bzw. Gewebe weitestgehend unklar. Ziel dieser Arbeit war es daher, die potenzielle Heterogenität in Th9-Zellen im Kontext einer allogenen Immunantwort zu untersuchen. Die Bearbeitung des Themas beinhaltete folgende Teilaspekte:

- I. Etablierung und Charakterisierung eines *in vitro*-Modellsystems zur Differenzierung allo-reaktiver Th9-Zellen
- II. Vergleichende funktionelle Charakterisierung allo-reaktiver Th9- und Th1-Zellen im allogenen Hauttransplantationsmodell
- III. Analyse der Heterogenität und Identifizierung von Subpopulationen in allo-reaktiven Th9-Zellen auf Einzelzell-Ebene mittels Genexpressionsanalyse und Durchflusszytometrie
- IV. Untersuchung der funktionellen Relevanz identifizierter Subpopulationen für Th9-vermittelte Immunreaktionen

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

Antigen	Reaktivität	Klon	Fluorochrom	Hersteller	Verdünnung*
<i>Fluoreszenzmarkierte Antikörper</i>					
CD11c	Maus	N418	APC	Biolegend, San Diego, CA, USA	1:200
CD25	Maus	PC61	APC-Cy7	Biolegend, San Diego, CA, USA	1:200
CD26	Maus	H194-112	PE	Biolegend, San Diego, CA, USA	1:100
CD28	Maus	E18	PE	Biolegend, San Diego, CA, USA	1:100
CD3ε	Maus	145-2C11	APC	Biolegend, San Diego, CA, USA	1:100
CD4	Maus	RM4-5	BV785, BV711	Biolegend, San Diego, CA, USA	1:400
CD40L	Maus	208109	PE	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	1:10
CD44	Maus	IM7	AF700	Biolegend, San Diego, CA, USA	1:200
CD86	Maus	GL-1	PerCP	Biolegend, San Diego, CA, USA	1:100
CD96	Maus	6A6	BV421	BD Biosciences, Heidelberg, DEU	1:50
CTLA-4	Maus	UC10-4B9	BV605	Biolegend, San Diego, CA, USA	1:100
Foxp3	Maus	FJK-16s	FITC	eBioscience (jetzt Thermo Fisher**)	1:100
Helios	Maus	22F6	AF700	Biolegend, San Diego, CA, USA	1:100
I-A/I-E	Maus	M5/114.15.2	PE	eBioscience (jetzt Thermo Fisher**)	1:2000
IFN-γ	Maus	XMG1.2	APC	Biolegend, San Diego, CA, USA	1:600
IL-4	Maus	BVD6-24G2	FITC	eBioscience (jetzt Thermo Fisher**)	1:300
IL-9	Maus	RM9A4	PE, APC	Biolegend, San Diego, CA, USA	1:300
Nrp-1	Maus	k.A.	PerCP	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	1:10
TZR-β	Maus	H57-597	APC-Cy7, FITC	Biolegend, San Diego, CA, USA	1:100
<i>Fixierbare Amino-reaktive Viabilitätsfarbstoffe (kein Antikörper)</i>					
-	-	-	eFluor506	eBioscience (jetzt Thermo Fisher**)	1:1000
<i>Fc-Rezeptor-Block</i>					
CD16/32	Maus	2.4G2	-	BD Biosciences, Heidelberg, DEU	1:100
<i>Neutralisierende Antikörper (Zellkultur)</i>					
CD96	Maus	3.3	-	Biolegend, San Diego, CA, USA	5 / 50 µg/ml
IFN-γ	Maus	XMG1.2	-	DRFZ, Berlin, DEU	10 µg/ml
IgG1	Maus	RTK2071	-	Biolegend, San Diego, CA, USA	5 / 50 µg/ml
IL-12/-23 p40	Maus	C17.8	-	Biolegend, San Diego, CA, USA	10 µg/ml
IL-4	Maus	k.A.	-	DRFZ, Berlin, DEU	10 µg/ml
<i>Antikörper für Applikation in vivo</i>					
CD96	Maus	3.3	-	Biolegend, San Diego, CA, USA	250 µg /Tier
IgG1	Maus	RTK2071	-	Biolegend, San Diego, CA, USA	250 µg /Tier
IgG2a	Maus	C1.18.4	-	Bioxcell, West Lebanon, NH, USA	100 µg/Tier
IL-9	Maus	9C1	-	Bioxcell, West Lebanon, NH, USA	100 µg /Tier
<i>Antikörper für Immunhistochemie</i>					
CD3ε (aus Ziege)	Maus	polyklonal (M-20)	-	Santa Cruz Biotech., Dallas, TX, USA	
IgG-Biotin (aus Hase)	Ziege	polyklonal	-	Dianova, Hamburg, DEU	

* in 100 µl Färbevolumen

**Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen, Melsungen, DEU
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Einbettungsmittel Paraffin (Histosec Pastillen)	Merck, Darmstadt, DEU
Einschlussharz Korbitbalsam	Hecht, Kiel, DEU

Eosin-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol, absolut	J.T.Baker, Deventer, NLD
Ethanol, vergällt	J.T.Baker, Deventer, NLD
Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat (Titriplex III)	Merck, Darmstadt, DEU
FACS Clean/Rinse/Sheath Fluid	BD Biosciences, Heidelberg, DEU
Formaldehyd-Lösung, 37 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i> , FCS) Lot 344X und 605C	Biochrom, Berlin, DEU
Ionomycin	Biotrend Chemikalien, Köln, DEU
Mayers Hämlaunlösung	Merck, Darmstadt, DEU
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid-Lösung, 0,9 %	B. Braun Melsungen, Melsungen, DEU
Penicillin/Streptomycin, 10.000 U/ml / 10.000 µg/ml	Biochrom, Berlin, DEU
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Salzsäure, rauchend 37 %	Merck, Darmstadt, DEU
Trypanblau-Lösung, 0,4 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
VLE-RPMI 1640 mit stabilem Glutamin	Biochrom, Berlin, DEU
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.1.3 Chirurgische Instrumente

Bezeichnung	Hersteller
Augenschere OC497R	Aesculap AG, Tuttlingen, (B. Braun Melsungen), DEU
Gerade Schere spitz/stumpf	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, DEU
Iris Pinzette, Spitze gebogen, geriffelt	World Precision Instruments Germany GmbH, Berlin, DEU
Mikropinzette Uhrmacher BD330R	Aesculap AG, Tuttlingen, (B. Braun Melsungen), DEU

2.1.4 Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugsystem VacuSafe	Integra Biosciences, Fernwald, DEU
C1 Single-Cell Auto Prep System	Fluidigm, South San Francisco, CA, USA
CO ₂ Inkubator HERAcCell	Heraeus, Hanau, DEU
Computer Espresso D956/E85+ DTF (Windows 7)	Fujitsu Technology Solutions, Heidelberg, DEU
Computer iMac (OS X v10.6.8)	Apple Inc., Cupertino, CA, USA
Dampfsterilisator HST 3020	MLW, Schöneiche bei Berlin, DEU
Durchflussszytometer FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg, DEU
Durchflussszytometer LSRFortessa	BD Biosciences, Heidelberg, DEU
Durchflussszytometer LSRII	BD Biosciences, Heidelberg, DEU
Echtzeit-PCR-Gerät 7500 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Echtzeit-PCR-Gerät Biomark HD	Fluidigm, South San Francisco, CA, USA
Einfrierbox Nalgene Cryo 1 °C	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Flockeneisbereiter MF 36	Scotsman Ice Systems, Mailand, ITA
Fluoreszenzmikroskop AxioImager Z1	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, DEU
Großraum-Sterilisator Serie EC	Webeco, Selmsdorf, DEU
Heiz-/Kühltrockenblock CH-100	Lab4you, Berlin, DEU
IFC Controller MX	Fluidigm, South San Francisco, CA, USA
Kühl-, Gefrierschränke (-20 °C)	Liebherr, Bulle, CHE
Laborwaage PT150	Sartorius, Göttingen, DEU
LED-Mikroskop DM IL mit Kamera DFC340 FX	Leica, Wetzlar, DEU
Lichtmikroskop TMS	Nikon, Tokio, JPN
Magnetrührer mit Heizplatte	VWR, Radnor, PA, USA
Magnetseparator MidiMACS	Mitenyi Biotech, Bergisch Gladbach, DEU
Mehrkanalpipette Research 10 – 100 µl	Eppendorf, Hamburg, DEU
Mehrkanalpipette Research plus 0,5 – 10 µl	Eppendorf, Hamburg, DEU
Narkosemittelverdampfer Vapor 19.3	Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck, DEU
PCR Gerät DNA Thermal Cycler	PerkinElmer, Norwalk, USA
Pipette Research 0,5 – 10 µl	Eppendorf, Hamburg, DEU

Pipette Research 10 – 100 µl	Eppendorf, Hamburg, DEU
Pipette Research 10 – 200 µl	Eppendorf, Hamburg, DEU
Pipette Research 100 – 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, DEU
Pipette Research plus 0,1 – 2,5 µl	Eppendorf, Hamburg, DEU
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald, DEU
Rotlichtlampe	Dirk Rossmann GmbH, Burgwedel, DEU
Schwingmühle MM300	Retsch, Haan, DEU
Sicherheitswerkbank Antares 48	Biohit, Rosbach v. d. h., DEU
Sicherheitswerkbank NU 440-400E	Nuaire, Plymouth, MA, USA
Spektrophotometer Nano Drop	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, DEU
Tischzentrifuge 5415R (gekühlt)	Eppendorf, Hamburg, DEU
Tischzentrifuge Biofuge Pico	Heraeus, Hanau, DEU
Ultra-Tiefkühlschrank UF 755 G	Dometic, Solna, SWE
Vakuumzentrifuge Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg, DEU
Vortex Genie 2	Scientific Industries, NY, USA
Wasserbad Typ 1003	GFL, Burgwedel, DEU
Zählkammer Neubauer <i>improved</i>	Laboroptik, Lancing, GBR
Zellsortierer Arial	BD Biosciences, Heidelberg, DEU
Zentrifuge Multifuge 1 L-R	Heraeus, Hanau, DEU
Zentrifuge Multifuge X3R (gekühlt)	Heraeus, Hanau, DEU

2.1.5 Kommerzielle Versuchssysteme

Bezeichnung	Hersteller
48.48 Sample/Loading Kit	Fluidigm, South San Francisco, CA, USA
ArrayControl RNA Spikes (SPIKE 1)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Basic Kit mouse/rat FlowCytomix	eBioscience, San Diego, CA, USA (jetzt Thermo Fisher*)
C1 Single-Cell Reagent Kit for Preamp	Fluidigm, South San Francisco, CA, USA
CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit, mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, DEU
Detection System, Alkaline Phosphatase/RED	Dako Denmark A / S, Glostrup, DNK
EasySep Mouse B Cell Isolation Kit	Stemcell Technologies, Vancouver, CAN
Fixation and Permeabilization Solution	BD Biosciences, Heidelberg, DEU
FoxP3 Staining Buffer Set	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, DEU
Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer	Biolegend, San Diego, CA, USA
Mouse FlowCytomix Simplex Kits (IL-10, IL-1α, IL-6, TNF-α)	eBioscience, San Diego, CA, USA (jetzt Thermo Fisher*)
Naive CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit, mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, DEU
NucleoSpin RNA	Macherey-Nagel, Düren, DEU
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, DEU
RNeasy FFPE Kit	Qiagen, Hilden, DEU
RT ² Profiler PCR Array Mouse Cell Surface Markers	Qiagen, Hilden, DEU
Single Cell-to-CT qRT-PCR Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
SYBR Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TaqMan Gene Expression Assays**	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TaqMan Universal PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TaqMan Universal PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

* Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

** s. Tab. 2-2 für eine vollständige Auflistung aller verwendeten Assays inkl. weiterer Informationen (z. B. RefSeq, Assay-Lokalisation)

2.1.6 Mäusstämme

Bezeichnung	Hintergrund	Geschlecht	Alter	Lieferant
BALB/c	Inzucht	♂	2 – 3 Mo	Charles River Laboratories, Sulzfeld, DEU
C57BL/6N	Inzucht	♂	2 – 3 Mo	Charles River Laboratories, Sulzfeld, DEU
<i>OT-I-Rag1^{-/-}</i>	C57BL/6	♂	4 – 6 Mo	Prof. G. Willmsky*
<i>Rag1^{-/-}</i>	C57BL/6	♂	4 – 6 Mo	Eigenzucht
<i>Rag2^{-/-}</i>	C57BL/6	♂	4 – 6 Mo	Prof. G. Willmsky*

* Charité – Universitätsmedizin Berlin, Institut für Immunologie

2.1.7 Medikamente

Bezeichnung	Handelsname	Hersteller	Dosierung	Applikation
Carprofen	Rimadyl	Zoetis Deutschland, Berlin, DEU	5 mg/kg KG*	s. c.
Dexpanthenol	Bepanthen	Bayer AG, Leverkusen, DEU	1 Tropfen pro Auge	Salbe
Isofluran	Forene	AbbVie, Wiesbaden, DEU	1,0 bis 4,0 % in Luft	Inhalation
Ketamin	Ketamin 10 %	WDT eG, Garbsen, DEU	15 mg/kg KG*	i. p.
Medetomidin	Cepetor	CP-Pharma, Burgdorf, DEU	0,125 mg/kg KG*	i. p.

*KG, Körpergewicht

2.1.8 Rekombinante Proteine (Zytokine, Stimulanzen)

Bezeichnung	Hersteller
<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> (GM-CSF)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, DEU
IL-12	PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA
IL-2	PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA
IL-4	PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA
Lipopolysaccharid (LPS) von <i>E. coli</i> O127:B8	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
<i>Transforming growth factor</i> -(TGF-) β , porzin	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α)	PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA

2.1.9 Software

Bezeichnung	Entwickler
GraphPad Prism v6	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
Image J 1.48v	Wayne Rasband, Nat. Inst. of Health, Bethesda, MD, USA
BioMark Data Collection v4.2.1	Fluidigm, South San Francisco, CA, USA
R v3.3.1	R Foundation for Statistical Computing, Wien, AUT
Fluidigm Real-Time PCR Analysis v4.1.3	Fluidigm, South San Francisco, CA, USA
BD CellQuest Pro v5.2	BD Biosciences, Heidelberg, DEU
7500 Software v2.3	Life Technologies (jetzt Thermo Fisher Scientific)
R Paket <i>lmerTest</i> v2.0-33	Kuznetsova A <i>et al.</i> , 2016 (118)
R Paket <i>gplots</i> v3.0.1	Warnes GR <i>et al.</i> , 2016 (119)
BD FACSDiva Software v8.0.2	BD Biosciences, Heidelberg, DEU
FlowJo v9.9 oder v10.0.8	FlowJo, LLC, Ashland, OR, USA
FlowCytomix Pro Software v2.4	Bender MedSystems, Wien, AUT

2.1.10 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
6-Loch Zellkulturplatte (Flachboden, unbehandelt)	Corning Life Science, Durham, NC, USA
96-Loch PCR-Platte	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, DEU
96-Loch Zellkulturplatte (Flachboden) Cellstar	Greiner Bio-One, Frickhausen, DEU
C1 Single-Cell IFC für Präamplifizierung (5 – 10 / 10 – 17 μ m)	Fluidigm, South San Francisco, CA, USA
Einfriereröhrchen CryoPure	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
Einmalkanüle (Insulin) G 26 x 1/2" / \varnothing 0,45 x 12 mm	B. Braun Melsungen, Melsungen, DEU
Einmalkanüle G 18 x 1 1/2" / \varnothing 1,20 x 40 mm	B. Braun Melsungen, Melsungen, DEU
Einmalkanüle G 27 x 3/4" / \varnothing 0,40 x 20 mm	B. Braun Melsungen, Melsungen, DEU
Einmal-Rasierer Typ 182H	Wilkinson Sword, Solingen, DEU
Einwegskalpell Nr. 10	Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, JPN
Fixierbinde YPSIFLEX haft, kohäsiv	Holthaus Medical, Remscheid, DEU
Fixierpflaster Leukoflex 1,25 cm x 5 m	BSN medical, Hamburg, DEU
Gewebekleber Vetbond	3M, Neuss, DEU
Hautmarkierungsstift Securline	Aspen Surgical Products, Caledonia, MI, USA
Injektionskanüle Neoject 0,33 x 13 mm, 29G x 1/2"	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen, DEU
Keramikkügelchen \varnothing 2,8 mm	Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux, FRA
Labor-Glaswaren	Schott AG, Mainz, DEU

Mullkompresse, 10 x 10 cm	Hubei Haige Medical Instrument Co., Wuhan, CHN
PCR-Folie (selbstklebend)	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, DEU
Petrischale, Ø 5 / 10 cm	Corning Life Science, Durham, NC, USA
Pipettenspitzen (gestopft), 10 / 200 / 1000 µl	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, DEU
Pipettenspitzen Biosphere (gestopft), 0,5 - 20 µl (für C1)	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
Pipettenspitzen Micro Tips, 2,5 µl	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, DEU
Pipettenspitzen, 10 / 200 / 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
Polyethylenschlauch, Ø innen: 0,28 mm; Ø außen: 0,61 mm	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, DEU
Reaktionsgefäße, 0,5 / 1,5 / 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
Reaktionsgefäße, 15 / 50 ml	Corning Life Science, Durham, NC, USA
Rundbodenröhrchen, 5 ml	Corning Life Science, Durham, NC, USA
Salbentüll Lomatuell H	Lohmann & Rauscher, Neuwied, DEU
Serologische Pipetten, Falcon, 5 / 10 / 25 ml	Corning Life Science, Durham, NC, USA
Spritze Discardit II, 5 / 20 ml	BD Biosciences, Heidelberg, DEU
Spritze Injekt H, 1 ml	B. Braun Melsungen, Melsungen, DEU
Spritzenfilter, Porengröße 0,22 µm	Carl Roth, Karlsruhe, DEU
Transparentverband Tegaderm Roll	3M, Neuss, DEU
Untersuchungshandschuh Vasco Nitril	B. Braun Melsungen, Melsungen, DEU
Verschlussfolie Parafilm M	American National Can, Greenwich, CT, USA
Wasserbadschutz Akasolv Aqua Care	Akadia Chemie, Mannheim, DEU
Zellseparationssäule MS	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, DEU
Zellsiebe, 40 / 100 µm	Corning Life Science, Durham, NC, USA

2.1.11 Zusammensetzung von Puffern und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Einfriermedium	10 % (v/v) DMSO in FCS
FACS-Puffer	2 % (v/v) FCS, 0,1 % (w/v) NaN ₃ in 1 x PBS
Komplettmedium	10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin in VLE-RPMI 1640 mit stabilem Glutamin
MACS-Puffer	0,5 % (v/v) BSA (sterilfiltriert), 2 mM EDTA in 1 x PBS
MLC-Medium	50 µM β-Mercaptoethanol in Komplettmedium
PBS/FCS	2 % (v/v) FCS in 1 x PBS

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Allgemeines

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in *very low endotoxin*-(VLE-)RPMI 1640 Flüssigmedium mit stabilem Glutamin bei 37 °C, 90 % Luftfeuchte und 5 % CO₂-Gehalt. Das Medium wurde mit 10 % fötalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin ergänzt. Die im FCS enthaltenen Komplementfaktoren wurden durch eine 30-minütige Inkubation bei 56 °C inaktiviert. Das Arbeiten an einer Sicherheitswerkbank minimierte das Risiko einer Kontamination durch Mikroorganismen.

Zellzahl- und Viabilität wurden lichtmikroskopisch mit einer Neubauer *improved*-Zählkammer bestimmt. Dazu wurde die Zellsuspension (nach geeigneter Vorverdünnung) im Verhältnis 1:1 mit einer 0,4%igen Trypanblau-Lösung gemischt. Trypanblau dringt aufgrund der gestörten Membranintegrität nur in tote Zellen ein, sodass diese unter dem Mikroskop blau erscheinen, während vitale Zellen weiß leuchten. Die lebenden Zellen in den vier großen Eckquadraten der Zählkammer wurden ausgezählt und deren Mittelwert bestimmt. Die Multiplikation von Mittelwert, Verdünnungs- und Kammerfaktor (10^4) ergab die Konzentration lebender Zellen pro ml Zellsuspension.

2.2.1.2 Gewinnung reifer dendritischer Zellen aus Knochenmarkzellen

Dendritische Zellen (DC) wurden durch Kultivierung von primären Knochenmarkzellen in Anwesenheit des Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktors (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) gewonnen. Diese Methode wurde erstmals von Inaba *et al.* beschrieben (120). Die **Reifung** der DC wurde mit Tumornekrosefaktor-(TNF-) α oder Lipopolysaccharid (LPS) induziert. **Abb. 2-1** gibt den zeitlichen Ablauf der DC-Gewinnung wieder.

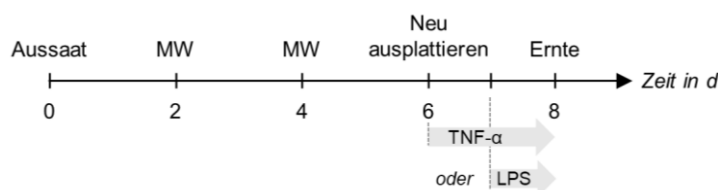


Abb. 2-1. Reife DC können innerhalb von 8 Tagen aus primären Knochenmarkzellen gewonnen werden. MW, Mediumwechsel, TNF- α , Tumornekrose-faktor- α , LPS, Lipopolysaccharid.

a. Isolierung und Kultivierung primärer Knochenmarkzellen

Mit Isofluran betäubte Mäuse wurden durch einen Genickbruch getötet. Oberschenkel- (Femora), Schienbein- (Tibia) und Oberarmknochen (Humeri) wurden von Muskelgewebe und Sehnen frei präpariert. Unter der Sterilwerkbank wurden die Knochen für 30 s in 70%igem Ethanol desinfiziert und in VLE-RPMI 1640 gewaschen. Anschließend wurden die Knochen geöffnet, indem die Gelenkkapseln mit einer Schere entfernt wurden. Die Markstränge wurden mithilfe einer Spritze, in der sich phosphatgepufferte Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) befand, und einer 27 G-Kanüle aus den Knochen gespült. Anschließend wurden die Stränge mit einer Pinzette zerteilt, durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren homogenisiert und zentrifugiert (5 min, 300 x g, 4 °C). Um die im Knochenmark enthaltenen Erythrozyten zu lysieren, wurde das Zellpellet in 1,5 ml sterilem destillierten Wasser (Angabe bezieht sich auf Zellmaterial aus max. 2 Mäusen) resuspendiert. Nach 15 s wurde die Lyse

durch Zugabe von 20 ml Kompletmedium (10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin in VLE-RPMI 1640 mit stabilem Glutamin) gestoppt. Nach einem Waschschrift wurde die Zellsuspension durch ein Nylonsieb mit einer Porenweite von 100 µm filtriert und auf eine Zelldichte von $0,45 \times 10^6$ Zellen pro ml eingestellt. Die Suspension wurde mit 6 ng/ml GM-CSF versetzt und auf einer unbehandelten (*non-tissue culture treated*) 6-Loch-Zellkulturplatte ausgesät ($1,8 \times 10^6$ Zellen in 4 ml pro Vertiefung). Die Zellen wurden für 6 d im Brutschrank inkubiert. Das Medium wurde alle 2 d gewechselt. Nach dieser Zeit waren die Knochenmarkzellen in adhärenz und nicht-adhärenz unreife DC differenziert.

b. Reifung der DC

Nach sechstägiger Kultivierung hatten sich die Zellen stark vermehrt. Sie wurden durch mehrfaches Spülen mit kaltem PBS aus der Platte geerntet, auf die ursprünglich ausgesäte Zelldichte eingestellt und auf eine neue 6-Loch-Platte ausgesät ($1,8 \times 10^6$ Zellen in 4 ml pro Vertiefung). Anschließend wurde die Reifung der DC durch Zugabe von 0,1 µg/ml TNF-α oder, 24 h später, durch 1 µg/ml LPS induziert. Alle Zellen wurden an d 8 durch wiederholtes Spülen mit kaltem PBS geerntet.

Reinheit (Expression von CD11c) und **Aktivierungsgrad** (Ko-Expression von MHC-II und CD86) wurden durchflusszytometrisch ermittelt. Nach 8 d waren etwa 70 – 80 % der Knochenmarkzellen in CD11c⁺ DC differenziert. Etwa 45 % der TNF-α- und sogar 70 % der LPS-behandelten DC exprimierten MHC-II und CD86 und zeigten damit einen aktivierten Phänotyp. Ohne Zugabe eines Reifungsstimulus lag der Anteil aktivierter DC durchschnittlich bei 15 %.

c. Optional: Kryokonservierung von primären Knochenmarkzellen

Überzählige Knochenmarkzellen (s. 2.2.1.2 a) wurden in 1 ml Einfriermedium (FCS mit 10 % Dimethylsulfoxid, DMSO) aufgenommen und in ein Einfrierrohrchen überführt. In einer Isopropanol-gefüllten Einfrierbox wurden die Zellen um – 1 °C/min auf – 80 °C gekühlt und dort bis zur Nutzung gelagert.

Zum Auftauen wurde das Röhrchen in der Hand angewärmt und durch Zutropfen von warmem Kompletmedium aufgetaut. Da DMSO bei Temperaturen über 0 °C zytotoxische Eigenschaften besitzt, wurde der Inhalt zügig in 25 ml Kompletmedium überführt. Nach einem zweiten Waschschrift wurde die Zellsuspension, wie in Abschnitt 2.2.1.2 a beschrieben, ausplattiert.

2.2.1.3 Gewinnung primärer CD4⁺ T-Zellen und CD19⁺ B-Zellen

CD4⁺ T-Zellen und CD19⁺ B-Zellen wurden durch magnetische Negativselektion aus Einzelzell-Suspensionen von murinen Milz- und Lymphknotenzellen angereichert.

a. Aufarbeitung der lymphatischen Organe

Milz und Lymphknoten (popliteal, inguinal, axillär, brachial, zervikal superfizial, mesenterial, lumbal) wurden aus Isofluran-betäubten und durch Genickbruch getöteten Mäusen entnommen. Unter sterilen Bedingungen wurden Milz und Lymphknoten getrennt voneinander mit dem Stempel einer Spritze durch 100 µm-Siebe in PBS-gefüllte Petrischalen gedrückt. Nach einem Zentrifugationsschrift (8 min, 300 x g, 4 °C) wurden die Lymphknotenzellen in PBS mit 2 % FCS (PBS/FCS) aufgenommen, filtriert (40 µm-Sieb) und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Die Milzzellen wurden nach Zentrifugation in 2 ml PBS resuspendiert. Nachfolgend wurden die Erythrozyten durch Zugabe von 4 ml sterilem destilliertem Wasser lysiert. Die Lyse wurde nach 10 s durch Zugabe von 20 ml PBS/FCS gestoppt. Die Zellen wurden zentrifugiert, in PBS/FCS aufgenommen und filtriert (40 µm-Sieb). Anschließend wurden Milz- und Lymphknotenzellen vereint.

b. Magnetische Zellseparation (Negativselektion)

Bei der magnetischen Negativselektion werden sämtliche **irrelevanten Zellen** markiert und depletiert. Dazu wird die Zellsuspension mit einem Gemisch aus Biotin-konjugierten monoklonalen Antikörpern, gerichtet gegen die verschiedenen Antigene der zu depletierenden Zellen, inkubiert. Anschließend binden paramagnetische, anti-Biotin-gekoppelte Partikel an die ersten Antikörper. In einem Magnetfeld werden die irrelevanten Zellen, im Gegensatz zu den nicht-markierten Zielzellen, zurückgehalten.

Für die Isolation von CD4⁺ T-Zellen aus Milz- und Lymphknotenzellen (s. vorheriger Abschnitt) wurde die **säulenbasierte magnetic activated cell separation**-(MACS-)Technologie der Firma Miltenyi benutzt. Hierbei werden die markierten Zellen durch eine im magnetischen Feld befindlichen Säule zurückgehalten. Die Isolation wurde mit dem *CD4⁺ T Cell Isolation Kit (mouse)* oder dem *Naive CD4⁺ T Cell Isolation Kit (mouse)* gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Letzteres bewirkt durch zusätzliche Antikörper gegen CD25 und CD44 die Depletion von aktivierten T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen. Durchschnittlich enthielt die Suspension aus Milz und Lymphknoten 20 % CD4⁺ bzw. 3 % naive CD4⁺ T-Zellen, die jeweils mit einer Reinheit von > 95 % isoliert wurden.

CD19⁺ B-Zellen wurden gemäß Herstellerprotokoll mit dem *EasySep Mouse B Cell Isolation Kit* (Stemcell) angereichert. Bei diesem **nicht-säulenbasierten** Verfahren wird ein Röhrchen mit der markierten Zellsuspension in einen Magnetblock platziert. Nach Anlagerung der magnetischen Zellen an die Wand des Röhrchens kann die nicht-gebundene Zielfraktion abgekippt werden. Die durchschnittliche B-Zell-Ausbeute lag bei 42 %.

2.2.1.4 Gemischte Leukozytenkultur

Die gemischte Leukozytenkultur (*mixed leukocyte culture*, MLC) ist ein Modell der allo-genen T-Zellaktivierung. Hierbei werden Leukozyten eines potenziellen Organspenders (**Stimulatorzellen**) mit Leukozyten des Empfängers (**Responderzellen**) für einige Tage ko-kultiviert. Bei Nichtübereinstimmung der Haupthistokompatibilitätsantigene (*major histocompatibility complexes*, MHC) beginnen allo-reaktive T-Zellen zu proliferieren und differenzieren in Effektor-T-Zellen.

DC und B-Zellen fungierten als Stimulatorzellen und CD4⁺ T-Zellen als Responderzellen. Sie wurden aus den MHC-unverträglichen Mausstämmen C57BL/6N (MHC-Haplotyp: H2^b) und BALB/c isoliert (H2^d). Die Stämme wurden sowohl als Spender als auch als Empfänger eingesetzt, die jeweils verwendete Kombination ist den Bildunterschriften im Ergebnisteil zu entnehmen. 3 x 10⁵ CD4⁺ T-Zellen wurden mit 3 x 10⁵ B-Zellen (1:1) bzw. 5 x 10⁵ CD4⁺ T-Zellen mit 4 x 10⁴ DC (12,5:1) in MLC-Medium (50 µM β-Mercaptoethanol in VLE-RPMI 1640 mit stabilem Glutamin, 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin) über einen Zeitraum von 1 – 7 d in 96-Loch-Zellkulturplatten (200 µl pro Vertiefung) ko-kultiviert. **Tab. 2-1** listet die Protokolle auf, die zur Differenzierung von allo-reaktiven Th1-, Th2- und Th9-Zellen verwendet wurden.

Tab. 2-1. Differenzierungsprotokolle.

Polarisierung	IL-2	IL-4	IL-12	TGF-β	α-IFN-γ	α-IL-4	α-IL-12
	ng/ml				µg/ml		
unpolarisiert (Th0)	-	-	-	-	-	-	-
Th1	5		10			10	
Th2	2	50			10		10
Th9		50		5			

a. Antigen-spezifische Re-Aktivierung

Allo-reaktive Th9-Kulturen wurden nach 3 d geerntet. Die T-Zellen wurden magnetisch von den DC getrennt (*CD4⁺ T Cell Isolation Kit*) oder durchflusszytometrisch (Abschnitt 2.2.2.2) in $CD3^+CD4^+TZR-\beta^+CD44^+CD25^+CD96^{high}$ bzw. $-CD96^{low}$ Zellen sortiert. Die Anreicherung von $CD25^+$ Zellen basierte auf der Beobachtung, dass $IL-9^+$ Zellen ausschließlich in der $CD25^+$ Fraktion auftraten (s. Abb. 3-8A).

Die Zellen wurden in 100 μ l MLC-Medium mit 50 ng/ml IL-4 und 5 ng/ml TGF- β pro Vertiefung auf einer 96-Lochzellkulturplatte ausgesät. Nach einer Ruhephase von 24 h wurden die Zellen durch Zugabe von LPS-gereiften DC in 100 μ l MLC-Medium mit 50 ng/ml IL-4 und 5 ng/ml TGF- β für bis zu 3 d re-aktiviert. Während magnetisch separierte $CD4^+$ Th9-Zellen auch nicht-aktivierte Zellen enthielten, handelte es sich bei allen $CD96^{high}$ und $CD96^{low}$ Th9-Zellen aufgrund der Anreicherung von $CD44^+$ bzw. $CD25^+$ Zellen ausschließlich um aktivierte Zellen. Letztere proliferierten stärker und benötigten mehr Nährstoffe, sodass entsprechend weniger Zellen ausgesät wurden: 5×10^5 $CD4^+$ Th9-Zellen + 4×10^4 DC (12,5:1); $2,5 \times 10^4$ $CD96^{high}$ bzw. $CD96^{low}$ Th9-Zellen + $0,5 \times 10^4$ DC (5:1). Im Fall einer durch starkes Zellwachstum bedingten Ansäuerung des Mediums (Farbumschlag des Indikators Phenolrot nach gelb) wurde das Medium teilweise durch frisches ersetzt. Der zeitliche Ablauf der experimentellen Re-Aktivierung ist in Abb. 2-2 zusammengefasst.

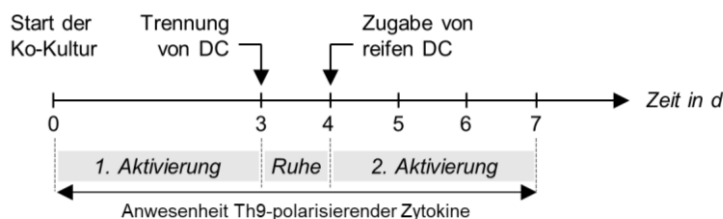


Abb. 2-2. Re-Aktivierung von allo-reaktiven Th9-Zellen durch erneuten Antigenkontakt. Die Zellen wurden durchgängig in Medium mit 50 ng/ml IL-4 und 5 ng/ml TGF- β (= Th9 polarisierende Zytokine) kultiviert. DC, dendritische Zelle.

2.2.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Quantifizierung verschiedener physikalischer und molekularer Parameter einer Zell- oder Partikelpopulation und basiert auf der **Emission von optischen Signalen** in Form von Streu- und Fluoreszenzlicht. Diese werden erzeugt, indem die Zellen in einem laminaren Probenstrom einzeln an einem **Laser** vorbeigeführt werden. Abhängig von der Menge des gestreuten Lichtes können Rückschlüsse auf die Größe der Zelle (Vorwärtsstreulicht, *forward scatter*, FSC) sowie auf ihre Granularität (Seitwärtsstreulicht, *side scatter*, SSC) gezogen werden. Zusätzlich erlaubt der Einsatz spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper den Nachweis von extrazellulären und intrazellulären Proteinen.

2.2.2.1 Detektion von extra- und intrazellulären Proteinen

Alle Färbungen wurden bei 4 °C unter Lichtausschluss in einem Endvolumen von 100 μ l durchgeführt. Zentrifugationsschritte erfolgten mit 300 oder 500 x g für 5 min bei 4 °C.

a. Viabilitätsfärbung und Blockierung der Fc-Rezeptoren

Bis zu 3×10^6 Zellen wurden pelletiert (300 x g) und zweimal mit PBS gewaschen um FCS-Rückstände zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 μ l des 1:10 verdünnten Viabilitätsfarbstoffs *Fixable Viability Dye eFluor 506* und 0,1 μ l anti-CD16/32 für 15 min in PBS gefärbt. Der Viabilitätsnachweis basiert auf der Bindung freier Protein-Aminogruppen ($-NH_3$). Während der Farbstoff in lebenden Zellen

nur mit Oberflächenproteinen reagieren kann, sind in toten Zellen aufgrund der erhöhten Membranpermeabilität auch intrazelluläre Proteine zugänglich. Durch die Behandlung mit anti-CD16/32 wurden die Rezeptoren FcγIII (CD16) und FcγII (CD32) auf den Zellen blockiert. So wurde bei nachfolgenden Färbeschritten eine unspezifische Bindung der fluoreszenzmarkierten Antikörper über ihren Fc-(*fragment crystallisable*-)Teil verhindert.

b. Oberflächenfärbung

Die Zellen wurden mit 1 ml FACS-Puffer (PBS mit 2 % FCS und 0,1 % Natriumazid) gewaschen und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen Oberflächenantigene inkubiert. Eine vollständige Auflistung der eingesetzten Antikörper-Klone, der Fluoreszenzfarbstoffe und Konzentrationen ist bitte Abschnitt 2.1.1 zu entnehmen. Nach 15 min wurden die Zellen mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen (300 x g).

c. Intrazelluläre Zytokinfärbung

Bis zu 3×10^6 Zellen wurden in 500 µl MLC-Medium aufgenommen und für 4 h bei 37 °C mit oder ohne 10 ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und 1 µg/ml Ionomycin inkubiert. PMA ist ein Diazylglycerin-Analogon und aktiviert die Proteinkinase C. Dagegen verursacht Ionomycin, ein Ionophor, einen intrazellulären Anstieg der Kalziumkonzentration. Gemeinsam aktivieren sie die Transkriptionsfaktoren AP-1, NFAT und NF-κB und verstärken so unspezifisch die T-Zellaktivierung und die Zytokinproduktion. Nach 2 h wurde der Proteintransport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat und damit die Freisetzung der Zytokine durch Zugabe von 2 µg/ml Brefeldin A blockiert.

Um den Zugang zu intrazellulären Antigenen bei gleichzeitiger Konservierung des Zellinhaltes zu gewährleisten, wurden die Zellen für 20 min mit 200 µl *Fixation and Permeabilization Solution* behandelt. Dadurch verringerte sich die Größe der Zellen, sodass die relative Zentrifugalbeschleunigung in nachfolgenden Waschschritten auf 500 x g erhöht wurde. Nach zweimaligem Waschen mit *Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer* wurden die Zytokine für 30 min angefärbt. Die Zellen wurden anschließend mit 1000 µl *Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer* gewaschen, in FACS-Puffer aufgenommen und mit einem Durchflusszytometer analysiert bzw. sortiert (s. Abschnitt 2.2.2.2).

d. Intrazelluläre Foxp3-Färbung

Für die simultane Analyse von Foxp3- und Zytokinexpression wurde das *FoxP3 Staining Buffer Set* (Miltenyi) gemäß Herstellerprotokoll verwendet.

e. Datenerfassung und -auswertung

Die Proben wurden mit einem LSRII oder LSRFortessa (BD FACSDiva Software) aufgenommen und mit der Software FlowJo v9.9 oder v10.0.8 ausgewertet. Messungen, die den Einsatz von < 4 fluoreszenzmarkierten Antikörpern erforderten (z. B. Reinheitsmessungen), wurden mit einem FACSCalibur (Software BD CellQuest Pro) durchgeführt. Von allen Analysen wurden Dubletten und tote Zellen ausgeschlossen (**Abb. 2-3**). Die Konfigurationen der Durchflusszytometer sind dem Anhang beigelegt (s. Abschnitt 7.1.)

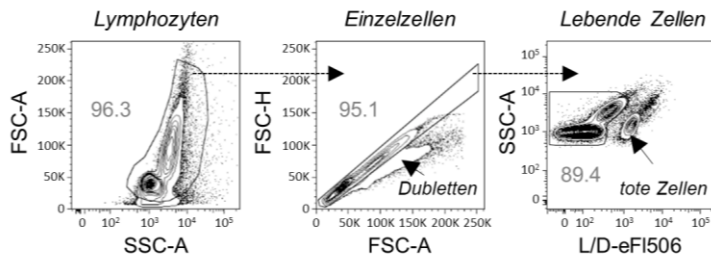


Abb. 2-3 Hierarchisches Vor-Gating. Von allen Analysen wurden Luftblasen und Zelldebris (Konturplot, links), Dubletten (Mitte) und tote Zellen (rechts) ausgeschlossen. FSC, forward scatter; SSC, side scatter; A, area (Signalfläche); H, height (Signalhöhe); L/D, live/dead (Viabilitätsfärbung).

2.2.2.2 Fluoreszenzbasierte Zellsortierung

Das Einsatzgebiet der Durchflusszytometrie umfasst neben der Zellcharakterisierung auch die Zellsortierung. Diese wurde von Dr. Désirée Kunkel, Dr. Sarah Warth oder Jens Hartwig im Durchflusszytometrie-Labor des Berlin-Brandenburger Centrum für regenerative Therapien (BCRT) mit einem FACSaria II durchgeführt. Es wurden intra- und/oder extrazellulär gefärbte Zellen sortiert. Ausschließlich extrazellulär markierte Zellen wurden in MACS-Puffer (PBS mit 0,5 % BSA und 2 mM EDTA) gefärbt. Bei diesen Proben war keine Restimulation mit PMA und Ionomycin notwendig. Aufgrund der daraus resultierenden geringen Frequenz an toten Zellen (< 5 %) wurde auf eine Viabilitätsfärbung verzichtet. Die Sortierungsstrategien sind in **Abb. 2-4** abgebildet.

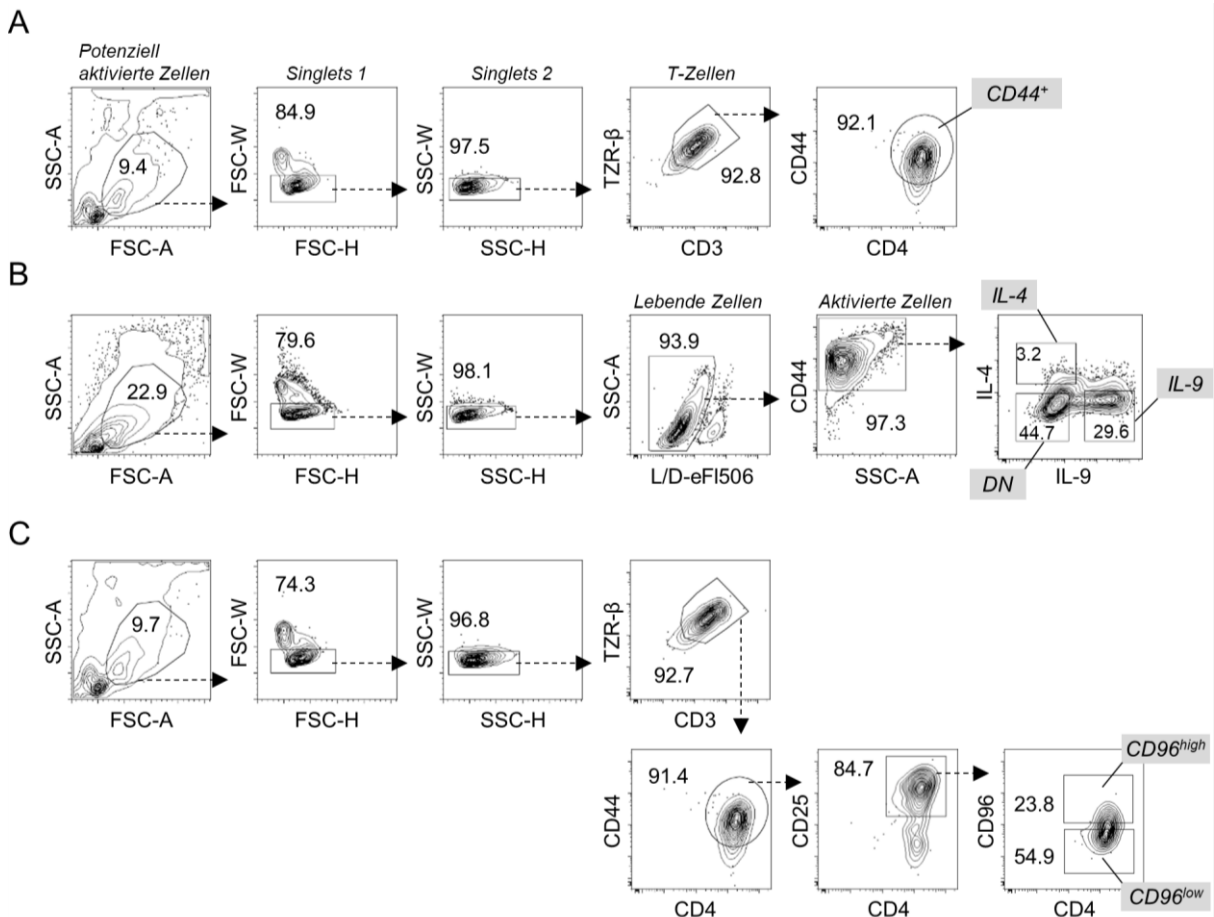


Abb. 2-4. Zellsortierungsstrategien. (A-C) Bei allen Proben wurde auf die großen granulären (potenziell aktivierten) Zellen gated (erster Konturplot v. l.). Dubletten wurden über zwei verschiedene Analysefenster (Gates) ausgeschlossen (zweiter und dritter Konturplot v. l.). (A) Strategie für die Anreicherung von CD44⁺ T-Zellen z. B. verwendet bei Transfer in *Rag*^{-/-} Mäuse oder Einzelzell-Genexpressionsanalyse. (B) Strategie für die Sortierung von IL-4⁺IL-9^{neg}(IL-4), IL-4^{neg}IL-9⁺ (IL-9) und IL-4^{neg}IL-9^{neg} (DN) Zellen für Genexpressionsstudie mittels Genexpressionsarray. (C) Strategie für die Isolierung von CD96^{high} und CD96^{low} Th9-Zellen u. a. für Transfer in *Rag*^{-/-} Mäuse. FSC, forward scatter; SSC, side scatter; A, area (Signalfläche); W, width (Signalbreite); H, height (Signalhöhe); L/D, live/dead (Viabilitätsfärbung); TZR-β, β-Kette des T-Zellrezeptors.

2.2.2.3 Bestimmung der Zytokinkonzentration im Zellkulturüberstand

Sekretierte Proteine können durchflusszytometrisch über einen sog. *Bead-Immunoassay* nachgewiesen werden. Bei dieser Multiplex-Methode binden kleine Partikel (*Beads*), die mit analytspezifischen Antikörpern überzogen sind, an ihr Antigen. Nachfolgend bindet ein zweiter analytspezifischer, Biotin-konjugierter Antikörper ebenfalls an das nachzuweisende Zytokin (anderes Epitop). Der Komplex aus Zytokin, *Bead* und Antikörper wird durch eine dritte Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin für die Erfassung im Durchflusszytometer markiert. Die Quantifizierung erfolgt über eine Standardkurve. Der Einsatz von unterschiedlichen Partikelgrößen ermöglicht die simultane Bestimmung von bis zu 20 Analyten.

Zellkulturüberstände wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Zytokine IL-1 α , IL-6, IL-10 und TNF- α wurden mit den entsprechenden mausspezifischen *FlowCytomix Simplex Kits* (eBioscience) gefärbt und mit einem FACSCalibur gemessen. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurden die Überstände mit 12,5 μl statt 25 μl *Bead-Mix* inkubiert. Für die Auswertung wurde die Software FlowCytomix Pro (v2.4) benutzt.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Extraktion von RNA

Für die RNA-Isolierung aus Zellen und Gewebe wurde das *NucleoSpin RNA Kit* (Macherey-Nagel) gemäß Herstellerangaben verwendet. Hauttransplantate wurden vor Transfer auf den *NucleoSpin Filter* mit 2,8-mm-Keramikkügelchen in Lysepuffer (350 μl RA1 + 3,5 μl β -Mercaptoethanol) für 6 min bei einer Frequenz von 30 s^{-1} in einer Schwingmühle homogenisiert. Die Zeit für den DNA-Verdau wurde von 15 min auf 30 min ausgedehnt und die Elution der RNA erfolgte mit 30 μl (statt 60 μl) RNase-freiem Wasser. Maximale Ausbeuten wurden erzielt, indem das Eluat ein zweites Mal auf die Säule gegeben wurde.

Für die Aufreinigung von RNA aus intrazellulär gefärbten, d. h. **Formaldehyd-fixierten** Zellen wurde das *RNeasy FFPE Kit* (Qiagen) verwendet. Dieses Versuchssystem wurde konzipiert für die Extraktion von RNA aus Formaldehyd-fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe (*formaldehyde-fixed paraffin-embedded*, FFPE). Da eine Entparaffinierung der Proben nicht notwendig war, entfielen die Schritte 1 – 5 des Herstellerprotokolls und die Zellen wurden direkt im *Proteinase K digestion buffer* resuspendiert. Eine Trennung von wässriger und paraffinhaltiger Lösung (Schritt 10) erübrigte sich dadurch ebenfalls. Die weitere Aufarbeitung erfolgte gemäß Herstellerangaben.

Konzentration und Reinheit der isolierten RNA wurden spektrophotometrisch mit einem *Nano Drop* ermittelt. Um das Risiko einer RNA-Degradierung durch omniprärente RNasen zu minimieren, wurde durchgängig mit gestopften Pipettenspitzen gearbeitet. Die RNA wurde bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.3.2 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Bei der reversen Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wird RNA durch das Enzym Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) umgeschrieben. Als Startpunkt für die PCR fungieren Oligonukleotide, die komplementär zum Poly-A-Schwanz eukaryotischer *messenger* RNA (mRNA) sind. Aufgrund dieser sog. Oligo-dT-Primer kann die cDNA als Abbild der Genexpression betrachtet werden.

12 µl gelöste RNA (max. 1 µg) wurden für 5 min bei 65 °C inkubiert, um die Sekundär- und Tertiärstruktur aufzulösen. Anschließend wurde die RNA auf Eis gekühlt und mit dem *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen) in cDNA umgeschrieben. Die Inkubationszeit für den Verdau der genomischen DNA mit dem *gDNA Wipeout Buffer* wurde auf 10 min erhöht. Durch eine Verlängerung der RT-Reaktionszeit auf 30 min wurde die cDNA-Ausbeute maximiert. Bei den übrigen Arbeitsschritten wurde das Herstellerprotokoll befolgt.

2.2.3.3 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Im Gegensatz zu einer einfachen PCR erfolgen Amplifizierung und Nachweis der PCR-Produkte bei der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) parallel in einem Reaktionsgefäß. Weiterhin werden die PCR-Produkte in Echtzeit quantifiziert. Eine Kombination aus reverser Transkription (2.2.3.2) und qPCR wird als **RT-qPCR** bezeichnet. Auf diese Weise kann ein spezifisches RNA-Produkt quantifiziert werden.

In dieser Arbeit wurden die PCR-Produkte durch sog. TaqMan-Sonden (auch Hydrolyse-Sonden) quantifiziert. Der Begriff Sonde bezeichnet ein zur Zielsequenz komplementäres Oligonukleotid, an dessen 5'-Ende ein fluoreszierender Reporterfarbstoff gekoppelt ist. Das Fluoreszenzsignal einer intakten Sonde wird durch einen Quencher-Farbstoff am 3'-Ende unterdrückt (**Förster-Resonanzenergietransfer, FRET**). Während eines PCR-Zyklus führt die 5' – 3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase zum Abbau der Sonde, sodass sich Reporter und Quencher räumlich voneinander entfernen. Die Reporterfluoreszenz kann nun nicht mehr durch den Quencher unterdrückt werden und ist detektierbar. Das Fluoreszenzsignal steigt proportional zur Anzahl der freien Reportermoleküle und wird nach jedem Zyklus aufgezeichnet. Sondenbindestellen über Exon-Grenzen verhindern die Detektion von kontaminierender genomischer DNA.

Die hier verwendeten *TaqMan Gene Expression Assays* bestanden aus spezifischen Vor- und Rückwärts-Primern sowie aus Sonden, die an den Reporterfarbstoff 6-Carboxyfluorescein (FAM) und an einen nicht-fluoreszierenden Quencher, einen sog. *minor groove binder* (MGB), gekoppelt waren. Alle PCR-Ansätze wurden als Doppelbestimmung mit 1,5 µl cDNA-Matrize und 11 µl Mastermix, bestehend aus 6,25 µl *TaqMan Universal PCR Master Mix*, 0,5 µl *TaqMan Gene Expression Assay* und 4,25 µl Wasser, pipettiert. Die qPCR wurde mit einem 7500 Real-Time PCR System und folgendem Protokoll durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Verdau kontaminierender PCR-Produkte durch Uracil-N-Glycosylase (UNG)*	50 °C	2 min	1
Inaktivierung der UNG, Aktivierung der AmpliTaq Gold	95 °C	10 min	1
Denaturierung	95 °C	15 s	40
Anlagerung und Extension	60 °C	1 min	
Kühlen	4 °C	∞	-

* Die dUTP Nukleotide sind im *TaqMan Universal PCR Master Mix* enthalten.

Für die relative Quantifizierung wurde der Ct-(*threshold cycle*)-Wert mit der 7500 Software (v2.3) bestimmt. Dieser Wert beziffert jenen Zyklus in der exponentiellen Phase der Amplifizierung, bei dem das Fluoreszenzsignal statistisch signifikant die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Die Expression des Zielgens wurde mit der Gleichung $\Delta Ct = Ct(\text{Zielgen}) - Ct(\text{Referenzgen})$ auf die Expression eines wenig regulierten Referenzgens normiert. Aufgrund der Annahme, dass sich die DNA-Menge pro Zyklus bei einer optimalen PCR-Effizienz annähernd verdoppelt, ergibt sich für die relative Genexpression $Ex = 2^{-\Delta Ct}$.

2.2.3.4 qPCR-Array (Genexpressionsarray)

Ein Genexpressionsarray dient der simultanen Quantifizierung vieler verschiedener Transkripte oder Proben. Es handelt sich um 96- oder 384-Lochplatten, in deren Vertiefungen sich gefriergetrocknete (lyophilisierte) Vorwärts- und Rückwärts-Primer zum Nachweis spezifischer Genprodukte befinden. Die PCR-Produkte können anschließend mithilfe von **DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen** wie z. B. SYBR Green I quantifiziert werden. Im Unterschied zu Hydrolyse-Sonden binden diese **unspezifisch** an die DNA. Der Komplex aus SYBR Green I und doppelsträngiger DNA emittiert nach Anregung Fluoreszenzlicht, wobei das Signal proportional zur Menge der PCR-Produkte ansteigt. Ungebundenes SYBR Green I absorbiert das Anregungslicht dagegen nicht. Der sequenzspezifische Nachweis erfolgt hier durch den Einsatz eines einzigen Primerpaares pro PCR-Ansatz.

Für Genexpressionsstudien in $CD3^+CD4^+TZR-\beta^+CD44^+$ und $CD44^+IL-4^{neg}IL-9^+$, $-IL-4^+IL-9^{neg}$ oder $-IL-4^{neg}IL-9^{neg}$ Zellen aus *in vitro*-differenzierten Th9-Kulturen wurde der vorgefertigte RT² Profile PCR Array „*Mouse Cell Surface Markers*“ von der Firma Qiagen verwendet. Neben 84 Genen, deren Genprodukte auf der Zelloberfläche verschiedener Immun- und Gewebezellen exprimiert werden, enthielt die 96-Lochplatte Primer zur Detektion von fünf Referenzgenen sowie verschiedene interne Kontrollen. Zunächst wurde aus den Zellen RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben (s. vorherige Abschnitte). Anschließend wurde die cDNA gemäß Herstellerangaben mit RNase-freiem Wasser verdünnt, mit *SYBR Green PCR Master Mix* (Thermo Fisher) gemischt und auf der PCR-Platte verteilt (25 µl pro Vertiefung). Die qPCR wurde mit dem 7500 Real-Time PCR System gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt (10 min bei 95 °C, 40 Zyklen à 15 s bei 95 °C und 1 min bei 60 °C).

Die Auswertung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Karsten Jürchott und der Programmiersprache R (v.3.3.1). Ein Ct-Toleranzwert (*cut-off*) von 35 wurde festgelegt und $\beta 2$ -Mikroglobulin (*B2m*) diente als Referenzgen. Differenziell exprimierte Gene wurden identifiziert, indem für jedes Gen die Varianz (s^2) über alle Gruppen berechnet wurde. Gene mit $s^2 > 0,5$ bzw. $s^2 > 1$ wurden einer hierarchischen Clusteranalyse mit euklidischem Distanzmaß unterzogen. Dafür wurde die Funktion *heatmap.2* (Standardeinstellung) aus dem R Paket *gplots* (v3.0.1) (119) verwendet. Die Expressionsdaten wurden für die Clusteranalyse skaliert und sind im *Heatmap*-Diagramm als $\text{Log}_2\text{Ex} = -[(\text{Ct}(\text{Zielgen}) - \text{Ct}(\text{B2m}))]$ dargestellt.

2.2.3.5 Einzelzell-Genexpressionsanalyse

Die Genexpression auf Einzelzell-Ebene wurde mit der Mikrofluidik-Chip-basierten C1-Technologie der Firma Fluidigm analysiert. In diesem mehrstufigen Verfahren werden die Zellen zunächst vereinzelt und lysiert. Die RNA wird dann in cDNA transkribiert und genspezifisch präamplifiziert. In einem separaten Schritt können die PCR-Produkte z. B. mit TaqMan-Sonden in einer quantitativen Echtzeit-PCR detektiert werden (**Abb. 2-7**).

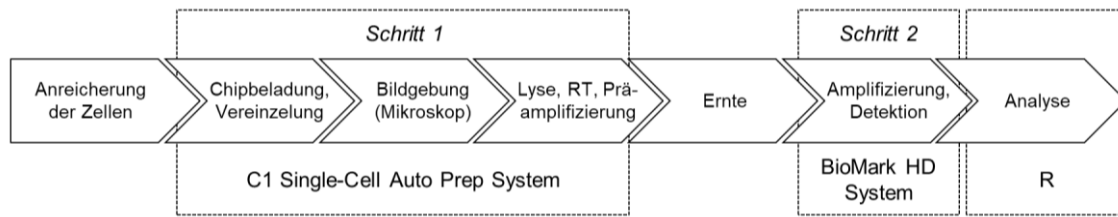


Abb. 2-5. Ablauf der C1-basierten Einzelzell-Genexpressionsanalyse. Die Zellen werden in Schritt 1 auf einen Chip geladen und mithilfe des C1 Single-Cell Auto Prep Systems vereinzelt. Nach visueller Inspektion mit einem Mikroskop erfolgt in einem automatisierten mehrstufigen Prozess die Lyse der Zellen, die Umschreibung von RNA in cDNA sowie die Präamplifizierung spezifischer Loci. Anschließend kann die präamplifizierte cDNA als Template in einer qPCR, durchgeführt mit dem BioMark HD System, eingesetzt werden. Die Datenanalyse erfolgte mit der Programmiersprache R. RT, reverse Transkription; qPCR, quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion.

a. Beladung, Bildgebung und Präamplifizierung

Die Zellsuspension wurde auf eine Konzentration von 750 Zellen/ μ l eingestellt und gemäß Herstellerprotokoll in einem Verhältnis von 3:2 mit *C1 Suspension Reagent* vermengt. Die Zellen wurden auf einen 5 – 10 oder 10 – 17 μ m *C1 Single-Cell PreAmp Integrated Fluidic Circuit-(IFC)-Chip* pipettiert. Dieser besteht aus einem Netzwerk an Flüssigkeitsleitungen, Ventilen und Kammern mit einem Fassungsvermögen im Nanoliter-Bereich. Das Programm *Cell Load (1782x/1783x)* des Single-Cell Auto Prep System-Gerätes realisierte die Verteilung der Zellen auf dem Chip und die Vereinzelnung von bis zu 96 Zellen in sog. *capture sites*. Da diese auch von Zelltrümmern oder mehreren Zellen besetzt werden können, wurde der Beladungszustand aller 96 *capture sites* mit einem Mikroskop überprüft und dokumentiert. Anschließend wurden die Reagenzien für die Zelllyse, die reverse Transkription und die Präamplifizierung gemäß Herstellerprotokoll auf den Chip pipettiert. Spezifische Loci wurden über 18 Zyklen präamplifiziert. Dazu wurde ein Gemisch aus den später zur Detektion verwendeten *TaqMan Gene Expression Assays* angefertigt und als Primer-Pool eingesetzt. Um technische Fehler bei der Präamplifizierung oder der nachfolgenden qPCR ausschließen zu können, wurde der *Lysis Final Mix* mit 9 pg eines synthetisch hergestellten RNA-Transkriptes (SPIKE 1, 750 Nukleotide) versetzt. Da der *Lysis Final Mix* gleichmäßig auf alle Proben verteilt wurde, sollte die SPIKE 1-Sequenz bei korrektem Reaktionsablauf in allen Proben gleichermaßen nachweisbar sein. Für die reverse Transkription und die Präamplifizierung wurde das Programm *PreAmp (1782x)* verwendet. Anschließend wurde die präamplifizierte cDNA nach einem speziellen Pipettierschema aus dem Chip geerntet und gemäß Herstellerangaben in einer 96-Loch-Platte in *C1 DNA Dilution RGT* verdünnt.

b. Quantifizierung der präamplifizierten cDNA

Die präamplifizierte cDNA wurde mittels qPCR und TaqMan-Sonden quantifiziert. Insgesamt wurde die Expression von 48 Genen inklusive 2 Referenzgenen (*B2m* und *Hprt*) und der RNA *spike-in*-Kontrolle analysiert (Tab. 2-2). Dazu wurden 48 der 96 präamplifizierten cDNA-Proben zusammen mit 48 *TaqMan Gene Expression Assays* auf einen *48.48 Gene-Expression Dynamic Array IFC* pipettiert. Luftblasen, die beim Pipettieren in den Vertiefungen des Chips entstanden waren, wurden mit einer 27 G-Kanüle zerstochen. Die Beladung der Reaktionskammern erfolgte mit einem *IFC Controller MX* mit dem Programm *Load Mix (113x)*. Anschließend wurde die qPCR bestehend aus 2 304 (48 x 48) Einzelreaktionen mit dem Protokoll GE 48x48 Standard v2.pcl des Herstellers und einem BioMark HD System durchgeführt. Für die Quantifizierung der präamplifizierten cDNA aus 96 Zellen war die Beladung von zwei *48.48 Gene-Expression Dynamic Array IFC* notwendig.

Tab. 2-2. Auflistung der für die Einzelzell-Genexpressionsanalyse verwendeten *TaqMan Gene Expression Assays* mit zusätzlichen Informationen. Assays mit > 1 RefSeq detektierten verschiedene Transkripte desselben Gens. Assay ID, Assay Identifizierungsnummer des Herstellers; RefSeq, Referenzsequenz; bp, Basenpaare.

Nr.	Gen	Assay ID	Transkript (RefSeq)	Exonübergang	Lokalisation	Amplikonlänge	Genlänge
					bp		
1	<i>Il9</i>	Mm00434305_m1	NM_008373.1	4-5	326	81	536
2	<i>Il4</i>	Mm00445259_m1	NM_021283.2	2-3	241	79	605
3	<i>Ifng</i>	Mm01168134_m1	NM_008337.3	3-4	469	100	1207
4	<i>Il10</i>	Mm00439614_m1	NM_010548.2	1-2	232	79	1306
5	<i>Il5</i>	Mm00439645_m1	NM_010558.1	1-2	186	82	1534
6	<i>Il13</i>	Mm99999190_m1	NM_008355.3	1-2	213	79	1217
7	<i>Il17a</i>	Mm00439619_m1	NM_010552.3	2-3	296	91	1171
8	<i>Il22</i>	Mm00444241_m1	NM_016971.2	1-2	215	86	1088
9	<i>Spi1</i>	Mm00488142_m1	NM_011355.1	3-4	495	91	1333
10	<i>Foxp3</i>	Mm00475164_m1	NM_001199347.1	10-11	1158	80	3832
11	<i>Tbx21</i>	Mm00450960_m1	NM_019507.2	1-2	682	69	2552
12	<i>Gata3</i>	Mm01337569_m1	NM_008091.3	4-5	1513	73	3257
13	<i>Irf4</i>	Mm00516434_m1	NM_013674.1	8-9	1282	95	4683
14	<i>Rorc</i>	Mm00441139_m1	NM_011281.3	2-3	135	76	2572
15	<i>Ms4a1</i>	Mm00545909_m1	NM_007641.5	5-6	676	91	2057
16	<i>Dpp4</i>	Mm00494552_m1	NM_010074.3	23-24	2471	92	5268
			NM_001159543.1	23-24	2471	92	3654
17	<i>Cd28</i>	Mm01253994_m1	NM_007642.4	3-4	610	98	4317
18	<i>Cd38</i>	Mm00483146_m1	NM_007646.4	7-8	900	95	2995
19	<i>Cd83</i>	Mm00486868_m1	NM_009856.3	4-5	568	98	2163
20	<i>Cd96</i>	Mm01342997_m1	NM_032465.2	14-15	1858	77	2203
21	<i>Cd200r1</i>	Mm01343881_m1	NM_021325.3	6-7	1110	87	1891
22	<i>Ctla4</i>	Mm01253995_m1	NM_009843.4	3-4	708	66	1933
23	<i>Il4ra</i>	Mm01275139_m1	NM_001008700.3	7-8	918	61	5122
24	<i>Tgfbr1</i>	Mm00436971_m1	NM_009370.2	8-9	1392	99	5735
25	<i>Tgfbr2</i>	Mm00436977_m1	NM_009371.3	6-7	1792	86	4803
			NM_029575.3	5-6	1717	86	4728
26	<i>Tgfbr3</i>	Mm00803538_m1	NM_011578.3	13-14	2595	96	6074
27	<i>Il1r1</i>	Mm00434237_m1	NM_001123382.1	6-7	1025	63	4808
			NM_008362.2	6-7	956	63	4739
28	<i>Il1r2</i>	Mm01239298_m1	NM_010555.4	4-5	643	83	1360
29	<i>Il9r</i>	Mm00434313_m1	NM_008374.2	8-9	1033	107	3083
			NM_001134458.1	8-9	1036	107	3086
30	<i>Ccr3</i>	Mm01216172_m1	NM_009914.4	1-2	201	98	3273
31	<i>Ccr4</i>	Mm04207878_m1	NM_009916.2	1-2	53	78	2787
32	<i>Ccr6</i>	Mm01323931_m1	NM_001190336.1	2-3	142	78	1324
			NM_001190338.1	1-2	138	78	1320
33	<i>Cxcr3</i>	Mm00438259_m1	NM_009910.2	1-2	103	58	1608
34	<i>Cd40lg</i>	Mm01303060_m1	NM_011616.2	2-3	300	102	1250
35	<i>Pdcd1</i>	Mm01285676_m1	NM_008798.2	1-2	132	64	1972
36	<i>Il1rl1</i>	Mm01233979_m1	NM_001025602.3	5-6	820	75	5308
			NM_010743.3	6-7	1028	75	3071
37	<i>Tnfrsf9</i>	Mm01268459_m1	NM_001077509.1	6-7	646	77	2115
			NM_011612.2	6-7	665	77	2134
38	<i>Il2ra</i>	Mm01340214_m1	NM_008367.3	7-8	990	106	4428
39	<i>Nrp1</i>	Mm01253206_m1	NM_008737.2	13-14	2545	87	5921
40	<i>Sell</i>	Mm01284454_m1	NM_011346.2	6-7	1066	87	2341
			NM_001164059.1	5-6	958	87	2213
41	<i>Tcaim</i>	Mm01352321_m1	NM_001013405.2	6-7	885	80	3053
42	<i>Il7r</i>	Mm01309415_m1	NM_008372.4	4-5	675	72	3227
43	<i>Klrg1</i>	Mm00516879_m1	NM_016970.1	3-4	380	81	1374
44	<i>Fas</i>	Mm01204974_m1	NM_007987.2	8-9	702	76	1486
45	<i>Itgae</i>	Mm00434443_m1	NM_008399.2	20-21	2520	69	3836
			NM_172944.2	20-21	2520	69	3813
46	<i>Hprt</i>	Mm00446968_m1	NM_013556.2	6-7	630	65	1349
47	<i>B2m</i>	Mm00437762_m1	NM_009735.3	1-2	111	77	858
48	SPIKE 1	Sonderanfertigung	-	-	-	-	750

c. Auswertung

Die Ct-Werte wurden mit der Fluidigm Real-time PCR Analysis Software (v4.1.3) berechnet und über die Gleichung $\text{Log}_2\text{Ex} = \text{LOD Ct} - \text{Ct (Gen)}$ in Expressionslevel konvertiert. LOD bezeichnet die Nachweisgrenze (*limit of detection*) und wurde auf einen Ct-Wert von 24 festgesetzt. Lieferte die Rechnung einen negativen Wert, so wurde die Expression als nicht detektierbar (ND) gekennzeichnet. Die Datenanalyse in R wurde in Kooperation mit Dr. Stephan Schlickeiser durchgeführt. Folgende Datenpunkte wurden von der Analyse ausgeschlossen: Zelltrümer (Debris), Proben mit > 1 Zelle, Proben ohne messbare Expression des Referenzgenes *B2m* und/oder der RNA *spike-in*-Kontrolle und Gene, die insgesamt von weniger als 10 Zellen exprimiert wurden. Die Expressionslevel der Referenzgene *B2m* und *Hprt* dienten internen Kontrollzwecken und wurden von der Hauptkomponentenanalyse sowie von der nicht-supervidierten hierarchischen Cluster-Analyse (Pearson-Korrelation) ausgeschlossen. Für die Darstellung wurde die Standardeinstellung der Funktion *heatmap.2* aus dem R Paket *gplots* (v3.0.1) (119) verwendet.

2.2.4 In vivo Methoden

2.2.4.1 Applikation von Zellen und Antikörpern

Am Tag vor der Hauttransplantation wurden 1 (bzw. 2) $\times 10^5$ $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{TZR-}\beta^+\text{CD44}^+$, $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{TZR-}\beta^+\text{CD44}^+\text{CD25}^+\text{CD96}^{\text{high}}$ oder $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{TZR-}\beta^+\text{CD44}^+\text{CD25}^+\text{CD96}^{\text{low}}$ Th9-Zellen in $150\ \mu\text{l}$ PBS in *Rag*-defiziente Empfängermäuse injiziert. Die Tiere wurden zunächst für $10\ \text{min}$ in einen Wärmeschrank ($28\ ^\circ\text{C}$) gesetzt, damit sich die Blutgefäße erweitern konnten. Anschließend wurde eine Inhalationsnarkose eingeleitet, indem die Tiere in eine geschlossene und mit $4\ \%$ Isofluran (in Raumluft) geflutete Box umgesetzt wurden. Nachdem der Stellreflex erloschen war, wurden die Tiere aus der Box entnommen und über eine Atemmaske mit $1 - 1,8\ \%$ Isofluran in Narkose gehalten. Für die Zellapplikation wurde die Schwanzvene mit der Nadel einer $29\ \text{G}$ -Kanüle punktiert, auf der ein $20\ \text{cm}$ langer Schlauch (\varnothing innen: $0,28\ \text{mm}$) steckte. Sobald etwas Blut in den Zugang rückgeflossen war, wurden die Zellen mithilfe einer Spritze in das Schlauchende injiziert. Das Totvolumen pro $10\ \text{cm}$ Schlauch betrug $6,2\ \mu\text{l}$.

In einigen Versuchen erhielten die Tiere zusätzlich zu den Zellen intraperitoneal (*i. p.*) einen anti-CD96 Antikörper (Klon 3.3, einmalige Applikation) oder einen anti-IL-9 Antikörper (Klon 9C1, fünfmalige Applikation über $6\ \text{d}$). Die Zeitpunkte der *i. p.*-Applikation sind **Abb. 2-6** zu entnehmen. Kontrolltiere erhielten Antikörper des gleichen Isotyps (IgG1 oder IgG2a), welche an nicht-vorhandene bzw. irrelevante Zielgene binden.

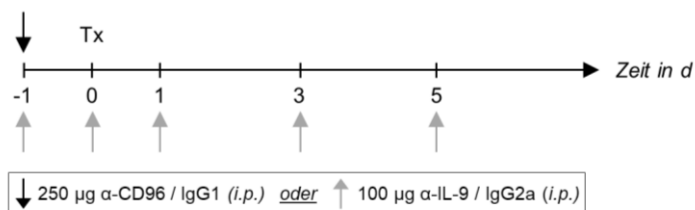


Abb. 2-6. Zeitpunkte der intraperitonealen (*i. p.*) Applikation von Antikörpern relativ zum Tag der Transplantation (Tx). Die Antikörper wurden in $150 - 200\ \mu\text{l}$ PBS gespritzt.

2.2.4.2 Allogene Hauttransplantation

a. Transplantatgewinnung

Das Spendertier wurde mit Isofluran betäubt und durch einen Genickbruch getötet. Der Schwanz wurde desinfiziert und am Ansatz abgetrennt. Die Schwanzhaut wurde der Länge nach mit einem Skalpell eingeschnitten und abgezogen. Die Haut wurde mit der Innenseite nach unten auf eine mit 0,9 % Kochsalz (NaCl) befeuchtete Mullkompressen gelegt und in 3 – 4 Rechtecke gleicher Größe geschnitten (0,8 x 1,1 cm). Bis zur Verwendung wurden die Transplantate in 0,9 % NaCl auf Eis gelagert.

b. Transplantation

Das Empfängertier wurde gewogen und zur Narkoseeinleitung in eine Box gesetzt, die mit 4 % Isofluran in Atemluft gefüllt war. Sobald der Stellreflex erloschen war, wurden 15 mg/kg Körpergewicht Ketamin und 0,125 mg/kg Körpergewicht Medetomidin (*i. p.*) appliziert. Zur postoperativen Schmerztherapie wurden 5 mg/kg Körpergewicht Carprofen subkutan (*s. c.*) in die Nackenfalte injiziert. Die Narkose wurde über eine Maske mit 1 – 1,8 % Isofluran in Raumluft aufrechterhalten.

Das Tier wurde mittig im oberen Rückenbereich rasiert. Zum Schutz der Kornea wurde eine Dexpanthenol-haltige Augensalbe aufgetragen. Anschließend wurde das Tier in Bauchlage auf einer von unten gewärmten Korkunterlage fixiert. Die Rückenhaut wurde desinfiziert und bis auf das OP-Feld mit Mullkompressen abgedeckt. Nach Erlöschen des Zwischenzehenreflexes wurde das Wundbett freipräpariert, wobei auf eine intakte *Fascia superficialis* geachtet wurde. Anschließend wurde das Transplantat eingepasst und mit Gewebekleber fixiert. Die Narkose wurde beendet und ein Verband bestehend aus vasilinierter Gaze, Mull und selbsthaftender Fixierbinde wurde angelegt. Abschließend wurde der Verband mit einer Lage wasserdichtem und atmungsaktivem Transparentverband geschützt. Um einer Hypothermie entgegenzuwirken wurde das Tier bis zum Erwachen in einen Wärmeschrank (28 °C) überführt. Postoperativ wurden die Tiere täglich begutachtet und gewogen. Der Verband wurde nach 5 d entfernt. Ein zu 80 % nekrotisches Transplantat wurde als abgestoßen betrachtet.

c. Aufarbeitung der Organe nach Versuchsende

Der Versuch wurde für alle Tiere beendet, sobald bei einem der Versuchstiere eine Gewichtsreduktion von 20 % gegenüber dem Ausgangsgewicht am Tag der Zellapplikation beobachtet wurde. Die Tiere wurden mit Isofluran betäubt und durch Genickbruch getötet. Sofern noch vorhanden, wurde das Transplantat mit einer Schere freipräpariert und für spätere histologische Untersuchungen in einer 3,7%igen Formaldehyd-Lösung fixiert. Ileum und Kolon wurden entnommen und jeweils mithilfe einer PBS-gefüllten Spritze und einer 18 G-Kanüle durchgespült. 8 – 10 mm lange Stücke des Ileums und des proximalen Kolons wurden reseziert und in eine 3,7%ige Formaldehyd-Lösung überführt. Weiterhin wurden die Transplantat-drainierenden (inguinal, axillär, brachial) und die mesenterialen Lymphknoten sowie die Milz entnommen und wie in Abschnitt 2.2.1.3a beschrieben, aufgearbeitet und gezählt. Zur Detektion der Zytokinproduktion wurden Milz- und Lymphknotenzellen für 4 h mit PMA und Ionomycin restimuliert. Die Anzahl re-isolierter T-Zellen ergab sich aus der Multiplikation der Gesamtzellzahl pro Organ mit der durchflusszytometrisch bestimmten Frequenz an CD3⁺TZR-β⁺ Zellen.

2.2.5 Histologie

Die Aufarbeitung der Gewebeproben erfolgte durch PD Dr. rer. medic. Anja A. Kühl (iPATH.Berlin – Immunopathologie für experimentelle Modelle, Berlin). Die Auswertung wurde an einem Axiolmager Z1 durchgeführt. Je Probe wurden die Zellen in 10 Hauptgesichtsfeldern (*high power field*, HPF; 0,237 mm²) gezählt. Um das Verhältnis von Villus-Höhe zu Krypten-Tiefe berechnen zu können, wurden die Längen von 10 Villi und 10 Krypten ausgemessen. Die Probenidentität war stets verblindet.

a. Allgemeines und Bestimmung des Entzündungsgrades

Nach Einbettung in Paraffin wurden von den formaldehyd-fixierten Gewebeproben 1 – 2 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden entparaffiniert, mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt und mit Korbitbalsam überschichtet. Der Entzündungsgrad des Hauttransplantates spiegelt die dermale und epidermale Infiltration mit Immunzellen wieder: 1 = minimal, 2 = mild, 3 = moderat, 4 = schwer. Je ein zusätzlicher Punkt wurde für den vollständigen Verlust der Epidermis sowie für Verschorfung verteilt. Damit war eine maximale Punktzahl von 10 möglich (4 + 4 + 1 + 1). Der Entzündungsgrad des Kolons wurde nach einem Bewertungssystem von Zimmermann *et al.* (121) berechnet. Dazu wurden die in Tab. 2-3 aufgeführten Parameter einzeln mit Punkten bewertet und aufsummiert (max. 18 Punkte). Abb. 2-7 veranschaulicht einige Entzündungsparameter anhand einer moderat entzündeten Kolonprobe.

Tab. 2-3. System zur histopathologischen Bewertung der Kolonproben (nach Zimmermann *et al.*). Der Parameter „Betroffene Fläche“ (in grau) entfiel, da nur ein Ausschnitt des Kolons analysiert wurde.

Parameter	Wert					
	0	1	2	3	4	5
Mukosale Infiltration	Keine	Mild	Moderat	Schwer		
Submukosale Infiltration	Keine	Minimal, fokal	Mild	Moderat, diffus	Schwer	transmural
Hyperplasie des Epithels	Keine	Mild	Moderat	Schwer		
Verlust der Becherzellen	Keine	Mild	Moderat	Schwer		
Kryptenabszesse	Keine	Sporadisch	Wenige	Viele	Kryptenverlust	
Betroffene Fläche	keine	< 25 %	< 50 %	> 50 %		

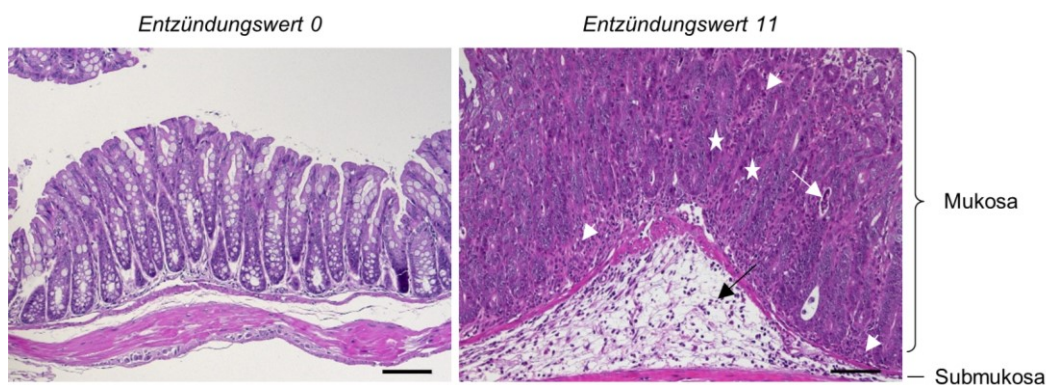


Abb. 2-7. Schnitte einer gesunden (li.) und einer moderat entzündeten Kolonprobe (re.). Im Vergleich zum gesunden Kolon zeigt das entzündete Kolon verlängerte Krypten mit Becherzellverlust (Sternchen), Leukozyteninfiltrate (kurzer Pfeil, weiß) und Kryptenabszesse (langer Pfeil, weiß). Die Submukosa (langer Pfeil, schwarz) ist ödematös und mit Immunzellen infiltriert. Die Aufarbeitung und Auswertung der Proben erfolgte durch PD Dr. Anja Kühl. Maßstab, 100 µm.

b. Detektion von T-Zellen

Die Schnitte wurden entparaffiniert und einer Hitze-induzierten Epitop-Rückgewinnung unterzogen. Anschließend wurden die Proben mit einem anti-CD3 ϵ Antikörper (M-20) aus der Ziege und nachfolgend mit einem Biotin-konjugierten anti-Ziege IgG Antikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte durch die Reaktion von alkalischer Phosphatase (Streptavidin-konjugiert) mit *Fast Red*-Chromogen. Die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gegengefärbt.

c. Detektion von eosinophilen Granulozyten

Eosinophile Granulozyten wurden mit einer modifizieren Siriusrot-Färbung sichtbar gemacht (122). Dazu wurden entparaffinierte Schnitte für 1 min mit Hämatoxylin gefärbt, gewaschen und für 2 h mit Siriusrot angefärbt. Anschließend erschienen die Granula der eosinophilen Granulozyten rot (Abb. 2-8).

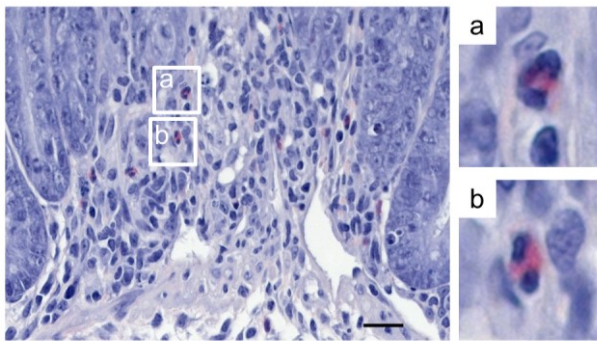


Abb. 2-8. Kolonschnitt mit eosinophilen Granulozyten detektiert durch modifizierte Siriusrot-Färbung. Die Ausschnitte a und b zeigen zwei eosinophile Granulozyten in einer höheren Vergrößerung. Die Probenaufarbeitung erfolgte durch PD Dr. Anja Kühl. Maßstab, 20 μ m.

2.2.6 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit den Programmen GraphPad Prism (v6) und R (v3.3.1) durchgeführt. Die Datensätze sind präsentiert als Streudiagramm mit Median, als Kastengrafik (Boxplot) oder als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes ($MW \pm SEM$). Die *Whisker* der Boxplots geben den unteren und den oberen Extremwert an. Überlebenszeiten sind als Kaplan-Meier-Kurven dargestellt und wurden mit einem Log-Rank-Test auf statistische Signifikanz überprüft. Die Auswertung der Gewichtsverläufe wurde mit dem R Paket *lmerTest* (118) durchgeführt. Dazu wurde ein lineares gemischtes Modell an die Gewichtsdaten angepasst. Der p-Wert des Interaktionsterms (Gruppe mit Zeit) wurde mit einem ANOVA-Typ-III-Test berechnet. Analysen in R wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Stephan Schlickeiser und Dr. Karsten Jürchott durchgeführt

Verbundene Stichproben wurden mit einem nicht-parametrischen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test auf signifikante Unterschiede getestet. Für nicht-verbundene Datensätze wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-Test gerechnet. Für die Überprüfung gerichteter Hypothesen wurde ein einseitiger Test angewendet, andernfalls ein zweiseitiger. Unterschiede zwischen > 2 Gruppen wurden mit einem nicht-parametrischen Friedman-Test (verbundene Stichproben) oder mit einem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test (nicht-verbundene Stichproben) ermittelt. Bei signifikanten Unterschieden wurden die p-Werte nachfolgend mit einem Dunn-Test für paarweise Vergleiche errechnet. Bei einem p-Wert kleiner 0,05 wurde das Testergebnis als statistisch signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

In der Literatur finden sich Hinweise auf eine funktionelle Heterogenität von Th9-Zellen. Weiterhin ist derzeit nur wenig über die Rolle von Th9-Zellen für das Überleben allogenen transplanterter Organe bekannt. Für die Bearbeitung der beiden Fragestellungen wurde zunächst ein *in-vitro*-Modellsystem zur Differenzierung allogener Th9-Zellen etabliert und charakterisiert. Anschließend wurden die Zellen im allogenen Hauttransplantationsmodell funktionell untersucht und mit abstoßungsauslösenden Th1-Zellen verglichen. Nachfolgend wurden die Heterogenität der Th9-Zellen auf Genexpressionsebene analysiert und die identifizierten Subpopulationen hinsichtlich ihrer funktionellen Relevanz betrachtet.

3.1 Eigenschaften *in vitro* differenzierter allo-reaktiver CD4⁺ Th9-Zellen

3.1.1 Fähigkeit zur IL-9-Produktion

In einer gemischten Leukozytenkultur (*mixed leukocyte culture*, MLC) wurde untersucht, ob und in welchem Umfang allo-reaktive T-Zellen IL-9 produzieren können. Die MLC ist ein Modell der allogeneren T-Zellaktivierung bei dem T-Zellen und MHC-nicht-identische Stimulatorzellen ko-kultiviert werden. Etwa 7 % der peripheren T-Zellen erkennen die fremden MHC-Antigene und proliferieren infolgedessen (111). Ihre Differenzierung in Effektor-T-Zellen wird durch das vorherrschende Zytokinmilieu beeinflusst. Dabei begünstigt die Anwesenheit der Zytokine IL-4 und TGF- β beispielsweise die Ausbildung eines IL-9-produzierenden Th9-Effektorphänotyps.

Starke Stimulatoren einer allogeneren T-Zellantwort sind dendritische Zellen (*dendritic cell*, DC) (123). Sie können aus primären Knochenmarkzellen durch Stimulation mit dem Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) gewonnen werden. Nach einer Kultivierungszeit von sechs Tagen sind die Vorläuferzellen in sog. unreife DC mit hoher Phagozytoseaktivität differenziert. Da sie sich jedoch durch eine geringe Expression ko-stimulatorischer (z. B. CD86) und antigen-präsentierender (MHC-II) Moleküle auszeichnen, können sie T-Zellen nur ineffizient aktivieren.

Die Hochregulierung dieser Moleküle wird als Reifung bezeichnet und erfolgt in Anwesenheit inflammatorischer Stimuli wie Lipopolysaccharid (LPS) oder Tumornekrosefaktor-(TNF-) α (Abb. 3-1A). Die Reifung der DC geht mit der Sekretion verschiedener Zytokine einher, wobei das Zytokinprofil von der Art des Reifungsstimulus bestimmt wird (Abb. 3-1B). Die Behandlung mit TNF- α führte z. B. zu 0,2 ng/ml (Median, \bar{x}) IL-6 im Überstand der DC. Die Interquartilsspanne (IQS), d. h. der Streubereich der mittleren 50 % der Daten, lag zwischen 0,1 und 0,3 ng/ml. Dagegen regte die Behandlung mit LPS die DC zur Produktion von deutlich mehr IL-6 sowie zur Sekretion von IL-1 α , IL-10 und TNF- α an (ng/ml im Überstand als \bar{x} [IQS]; IL-1 α : **0,9** [0,7 – 1,1]; IL-6: **21,6** [20,4 – 32,6]; IL-10: **0,8** [0,4 – 1,0]; TNF- α : **6,4** [5,6 – 7,4]).

LPS- und TNF- α -gereifte DC aus C57BL/6 Mäusen wurden zur Stimulation von CD4⁺ T-Zellen aus MHC-nicht-identischen BALB/c Mäusen eingesetzt. Abb. 3-1C und D zeigen, dass die T-Zellen nach dreitägiger Stimulation in Th9-polarisierender Umgebung tatsächlich IL-9 produzierten.

Dabei induzierte die Stimulation mit LPS-gereiften DC innerhalb der aktivierten (= CD44⁺) T-Zellen die vierfache Menge an IL-9⁺ Zellen im Vergleich zu TNF- α -behandelten DC (Abb. 3-1D; % IL-9⁺ Zellen in CD4⁺CD44⁺ als \bar{x} [IQS]; LPS-DC: **13,2** [7,7 – 16,9]; TNF- α -DC: **3,3** [2,5 – 7,5]). In Abwesenheit von IL-4 und TGF- β wurde nahezu kein IL-9 detektiert.

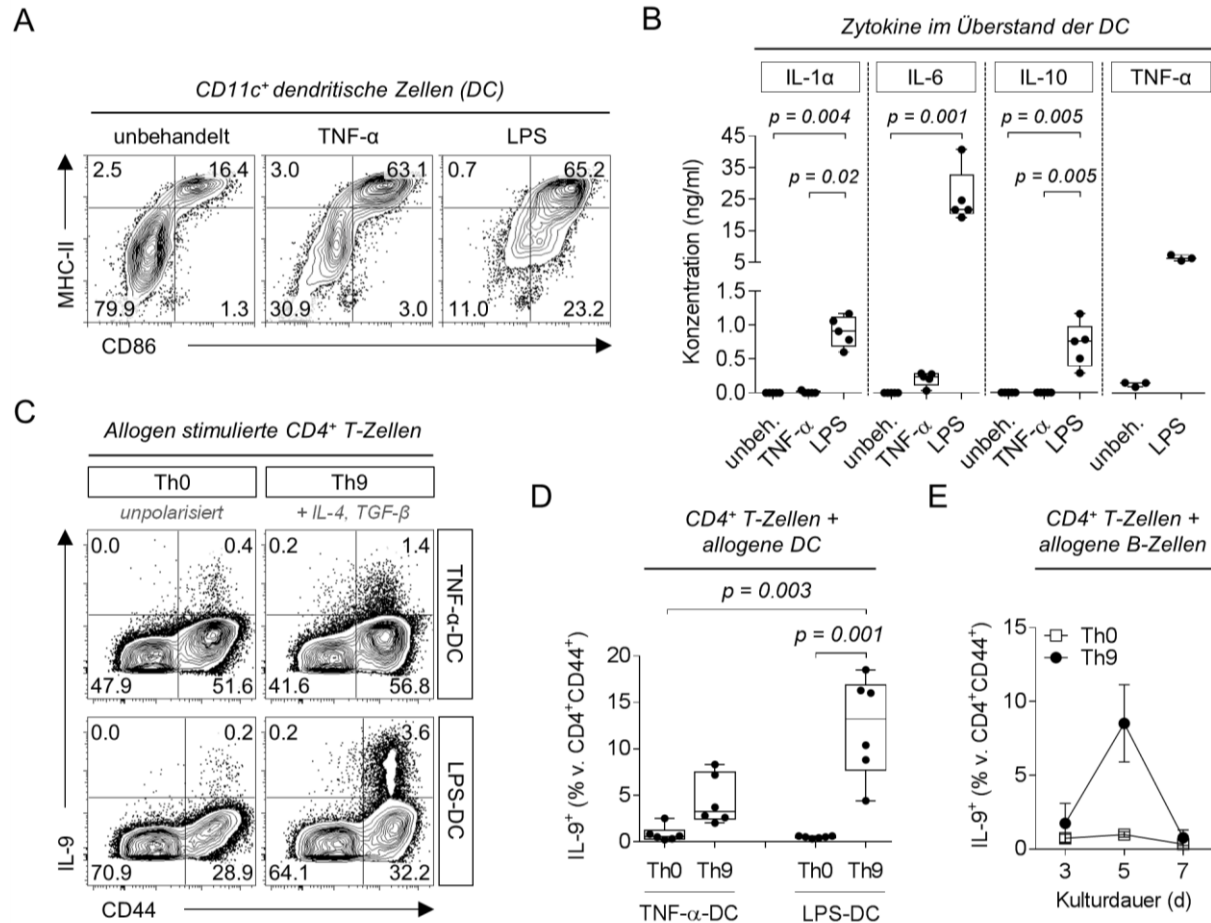


Abb. 3-1. Allogen aktivierte CD4⁺ T-Zellen können IL-9 produzieren. (A) Expression der Reifungsmarker I-A/I-E (MHC-II) und CD86 in unbehandelten C57BL/6 CD11c⁺ dendritischen Zellen (*dendritic cell*, DC) bzw. nach Reifung mit TNF- α oder LPS. (B) Zytokinkonzentrationen im Überstand unbehandelter (unbeh.), TNF- α - oder LPS-behandelter DC. Die Boxplots zeigen die Ergebnisse aus fünf bzw. drei (TNF- α) unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse für IL-1 α , IL-6 und IL-10 erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Dunn-Test für paarweise Vergleiche. (C, D) Intrazelluläre IL-9-Färbung in CD4⁺ BALB/c-T-Zellen nach dreitägiger allogener Stimulation durch TNF- α bzw. LPS-gereifte DC aus C57BL/6 Mäusen in Abwesenheit (Th0) oder Anwesenheit (Th9) der Th9-polarisierenden Zytokine IL-4 und *transforming growth factor- β* (TGF- β). Statistische Auswertung von sechs unabhängigen Versuchen (in D) mit Kruskal-Wallis- und Dunn-Test. (E) Verlauf der IL-9-Produktion in Ko-Kulturen aus BALB/c CD4⁺ T-Zellen und C57BL/6 CD19⁺ B-Zellen. Es sind Mediane und Spannweiten aus zwei unabhängigen Experimenten gezeigt. LPS, Lipopolysaccharid; TNF- α , Tumornekrosefaktor- α .

Neben DC eignen sich auch B-Zellen zur Stimulation einer allogenen T-Zellantwort. Aufgrund ihrer geringeren Expressionsdichte von MHC-Peptid-Komplexen und ko-stimulatorischen Molekülen (124, 125) verfügen B-Zellen jedoch über eine geringere T-Zellaktivierungseffizienz als DC. Entsprechend wurde die maximale IL-9-Frequenz erst nach fünftägiger Kultivierung beobachtet und lag mit 8,5 % (\bar{x}) auch niedriger als in Kulturen mit LPS-gereiften DC (Abb. 3-1E).

Diese Versuche zeigten, dass allo-reaktive T-Zellen zur Produktion von IL-9 angeregt werden konnten, wobei die Kinetik und das Ausmaß der IL-9-Produktion von den Stimulatorzellen beeinflusst wurde.

3.1.2 Optimierung und Stabilität

In Abschnitt 3.1.1 wurde für die allogene Stimulation die Gesamtheit der CD4⁺ T-Zellen verwendet. Diese setzt sich zusammen aus naiven, d. h. antigen^{unerfahrenen} (CD44^{neg}), und antigen^{erfahrenen} (CD44⁺) Zellen, den sog. Gedächtnis-T-Zellen. Um die Vermischung von reaktivierten allo-unspezifischen Gedächtnis-T-Zellen und allo-spezifischen T-Zellen zu vermeiden, wurde die MLC mit naiven (CD44^{neg}CD62L⁺) T-Zellen wiederholt.

Im Vergleich zur CD4⁺-Gesamtheit induzierte die Stimulation von naiven BALB/c CD4⁺ T-Zellen bei Th9-Polarisierung fast die fünffache Menge an IL-9⁺ T-Zellen (**Abb. 3-2A**, % IL-9⁺ in CD4⁺CD44⁺ als \bar{x} [IQS]; **62,3** [49,3 – 68,4]; vgl. CD4 (gesamt) **Abb. 3-1D, 13,2** [7,7 – 16,9]). In Versuchen mit inverser Mausstammkombination (C57BL/6 CD4⁺ T-Zellen und BALB/c DC) wurden vergleichbare Frequenzen an IL-9⁺ T-Zellen beobachtet (exemplarisch gezeigt in **Abb. 3-2B**). Der genetische Hintergrund der Mäuse – BALB/c Mäuse neigen zur Ausbildung einer Th2-Antwort, C57BL/6 Mäuse zur Th1-Antwort – scheint demnach keinen Einfluss auf ihre Fähigkeit zur IL-9 Produktion auszuüben. Des Weiteren zeigte sich die IL-9-Produktion nach Re-Aktivierung durch einen erneuten allogenen Kontakt über drei Tage stabil (**Abb. 3-2C**). Aufgrund der hohen IL-9-Frequenzen wurden alle weiteren Versuche (bis auf wenige Ausnahmen) mit naiven T-Zellen und LPS-gereiften DC durchgeführt.

In einem weiteren Experiment wurde das Th9-Differenzierungspotenzial allo-reaktiver T-Zellen mit ihrer Fähigkeit, andere Effektorphänotypen (Th0, Th1, Th2) auszubilden, verglichen (**Abb. 3-2D**). Ohne Zugabe polarisierender Zytokine (Th0) neigten die Zellen zur Ausprägung eines IFN- γ produzierenden Th1-Phänotyps. Durch den Zusatz von Zytokinen, die die Ausbildung einer Th1-Antwort begünstigten, stieg die IFN- γ -Produktion um das Dreifache auf 37,6 %. Die Produktion von IL-4 lag unter Th2-fördernden Bedingungen dagegen nur bei 6,8 %. Obwohl die allogene T-Zellaktivierung also *per se* mit der Ausbildung einer Th1-Antwort verbunden ist, wurden in Th9-polarisierender Umgebung mit 44,2 % sogar mehr T-Zellen in einen IL-9-produzierenden Phänotyp gelenkt als bei Th1-Polarisierung in IFN- γ -produzierende Effektorzellen. Demzufolge besaßen allo-reaktive T-Zellen ein hohes Th9-Differenzierungspotenzial.

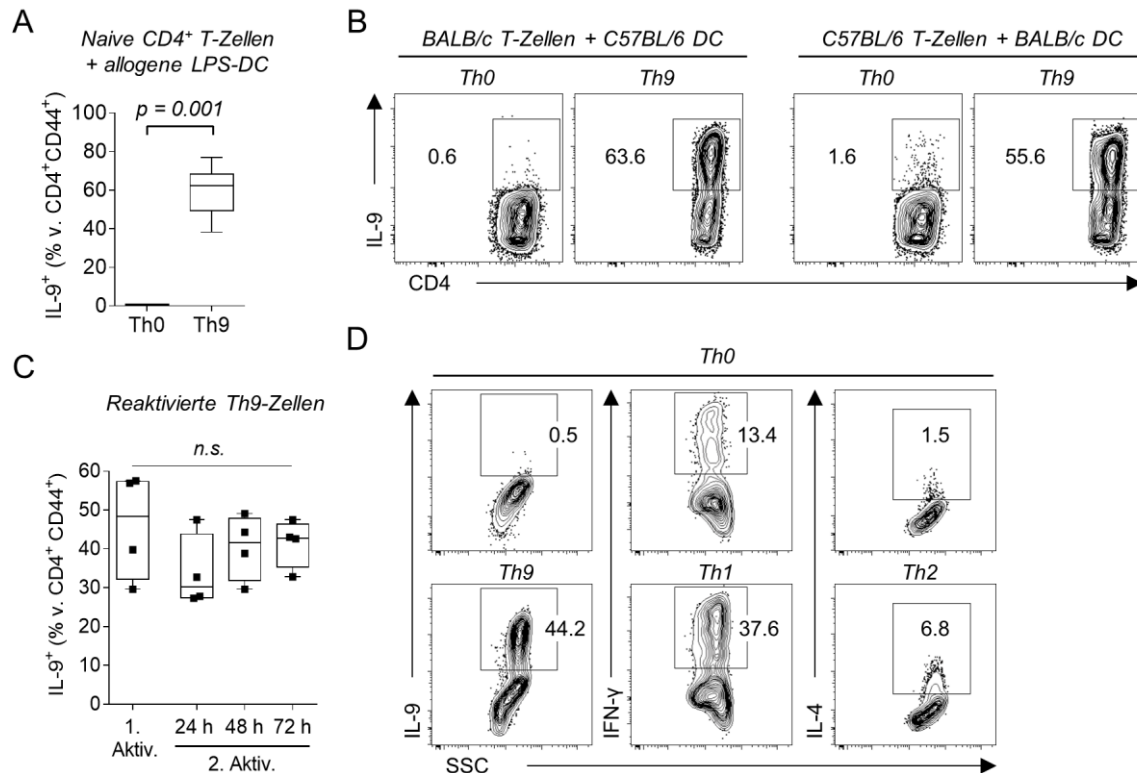


Abb. 3-2. Naive T-Zellen zeigen nach allogener Aktivierung in Th9-polarisierender Umgebung eine hohe und stabile IL-9-Produktion. Intrazelluläre Zytokinproduktion in allo-reaktiven ($CD44^+$) T-Zellen nach dreitägiger Aktivierung bzw. Re-Aktivierung von naiven T-Zellen durch LPS-gereifte dendritische Zellen (DC) in Abwesenheit (Th0) oder Anwesenheit Th9-, Th1- oder Th2-polarisierender Zytokine. (A) Ko-Kultur aus BALB/c $CD4^+$ T-Zellen und C57BL/6 DC ($n = 10$, einseitiger Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). (B) Vergleich der IL-9-Produktion in BALB/c und C57BL/6 $CD4^+$ T-Zellen nach Stimulation durch C57BL/6 bzw. BALB/c DC. (C) IL-9-Produktion in aktivierten (1. Aktiv.) und antigenspezifisch re-aktivierten (2. Aktiv.) C57BL/6 Th9-Zellen ($n = 4$, Kruskal-Wallis-Test). (D) Expression charakteristischer T-Helferzell-Zytokine in allo-reaktiven ($CD44^+$) BALB/c T-Zellen, die in Abwesenheit (Th0) oder Anwesenheit von Th9-, Th1- oder Th2-polarisierenden Zytokinen kultiviert wurden. DC, dendritische Zelle; LPS, Lipopolysaccharid; SSC, side scatter (Seitwärtsstreulicht); n. s., nicht signifikant ($p > 0.05$).

3.1.3 Einfluss von PMA und Ionomycin

Um die Zytokinproduktion auf ein im Durchflusszytometer detektierbares Maß anzuheben, ist oft notwendig, die T-Zellaktivierung unspezifische (d. h. TZR-unabhängig) zu verstärken. Häufig werden dafür die Substanzen Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und Ionomycin eingesetzt. Durch eine vierstündige Stimulation mit PMA und Ionomycin wurde beispielsweise die geringe Frequenz $IFN-\gamma^+$ T-Zellen in Th1-polarisierten Ko-Kulturen um das 18-fache angehoben (**Abb. 3-3A**, % $IFN-\gamma^+$ in $CD4^+CD44^+$ als \bar{x} [IQS]; – P/I: **1,9** [0,9 – 7,1]; + P/I: **34,1** [23,3 – 42,5]).

Interessanterweise war diese Restimulation für die Detektion von $IL-9^+$ T-Zellen in Th9-Ko-Kulturen nicht erforderlich. Unstimulierte und stimulierte Zellen zeigten ähnlich hohe Frequenzen an $IL-9^+$ T-Zellen, die stimulationsbedingt sogar leicht sank (**Abb. 3-3B**, % $IL-9^+$ in $CD4^+CD44^+$ als \bar{x} [IQS]; – P/I: **52,4** [48,6 – 63,4]; + P/I: **50** [41,7 – 60,6]). Ein PMA/Ionomycin-bedingter Anstieg der IL-9-Expression war nur *pro Zelle*, erkennbar an einer signifikant erhöhten IL-9-Fluoreszenzintensität, zu beobachten (**Abb. 3-3C**, geometrischer Mittelwert der Fluoreszenzintensität (gMFI) als \bar{x} [IQS]; – P/I: **5412** [4267 – 6585], + P/I: **7850** [6342 – 9902]).

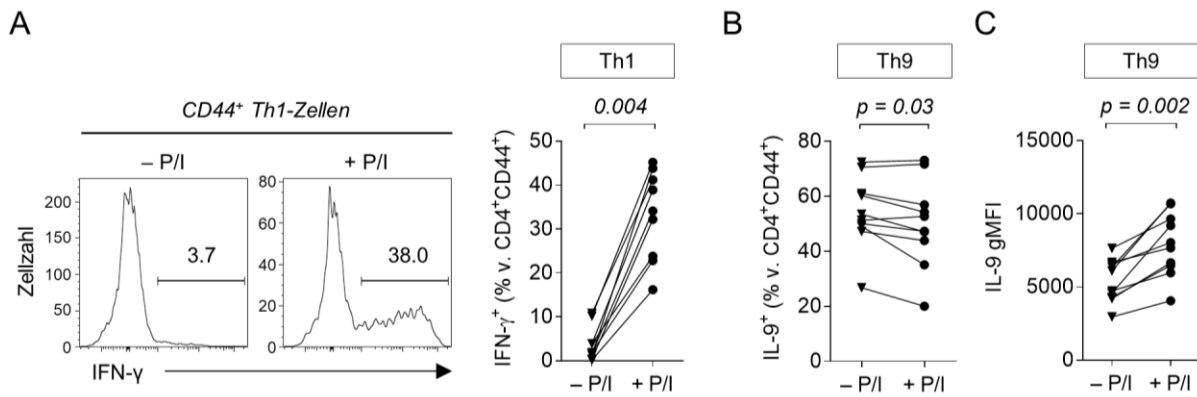


Abb. 3-3. PMA/Ionomycin-unabhängige Detektion von IL-9⁺ Zellen in Th9-Kokulturen. Vergleich der intrazellulären Produktion von (A) IFN- γ und (B, C) IL-9 in allo-reaktiven Th1- bzw. Th9-polarisierten C57BL/6 Kokulturen ohne (–) bzw. mit (+) Restimulation durch PMA und Ionomycin (P/I). Die statistische Auswertung von neun (Th1) bzw. zehn (Th9) unabhängigen Experimenten erfolgte unter Verwendung eines zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests. PMA, Phorbol-12-Myristat-13-Acetat; gMFI, *geometric mean fluorescence intensity*.

3.2 Das Zytokinprofil nach allogener Hauttransplantation

In vitro kann ein großer Teil der allo-reaktiven T-Zellen zur Produktion von IL-9 angeregt werden (s. Abschnitt 3.1.2). Nun wurde untersucht, ob und in welchem Ausmaß IL-9 nach allogener Transplantation – also *in vivo* – induziert wurde. Dazu erhielten C57BL/6-Mäuse ein Hauttransplantat von BALB/c Mäusen. Nach fünf Tagen, d.h. während der akuten Abstoßungsphase, wurden die mRNA-Expressionslevel von *Cd3*, *Il9*, *Ifng* und *Il4* im Transplantat bestimmt und mit der Menge in der untransplantierten Spenderhaut verglichen.

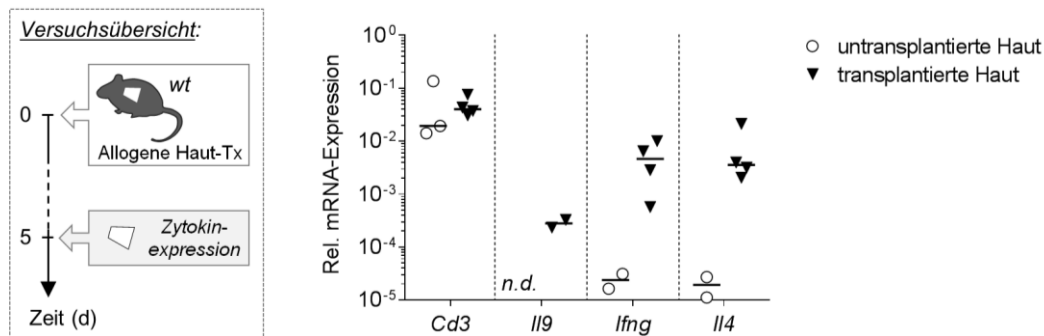


Abb. 3-4. Anstieg der mRNA-Expression von *Il9*, *Ifng* und *Il4* in allogen transplantierte Haut. *Versuchsablauf:* C57BL/6 Mäuse erhielten ein allogenes BALB/c Hauttransplantat. Nach fünf Tagen wurde die Expression verschiedener Zytokine auf mRNA-Ebene im Transplantat bestimmt. Relative (Rel.) mRNA-Expression in der Spenderhaut vor (untransplantierte Haut, n = 3 für alle Gene) bzw. fünf Tage nach (transplantierte Haut, n = 4 für alle Gene) Transplantation. Die Ergebnisse (falls detektierbar) sind relativ zur Expression des Referenzgenes *Hprt* dargestellt. Es ist der Median eingezeichnet. Haut-Tx, Hauttransplantation; wt, Wildtyp; n.d., nicht detektierbar; *Hprt*, Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase.

Im Vergleich zur Spenderhaut wurde in der transplantierten Haut neben einem zweifachen (×) Anstieg der *Cd3*-Expression als Maß für die T-Zell-Infiltration ein leichter Anstieg in der *Il9*-Expression beobachtet (Abb. 3-4). Während die Haut vor Transplantation keine messbare *Il9*-Expression aufwies, stieg die Expression in zwei von vier Transplantaten auf ein geringes,

jedoch detektierbares Level an. Dagegen war die Expression von *Ifng* und *Il4* auch in der untransplantierten Haut nachweisbar. Diese Beobachtung zeigt, dass gewebständige Lymphozyten zwar IFN- γ und IL-4, jedoch kein IL-9 produzierten. Im Transplantat erhöhte sich die Expression der *Ifng*-mRNA um das 195-fache (\times) und somit – wie schon *in vitro* beobachtet (vgl. **Abb. 3-2D**) – am stärksten. Daneben stieg auch die Transkription von *Il4* stark an (185-fach, \times). Demzufolge wurde die Transkription von *Il9* im Vergleich zu *Ifng* und *Il4* bei allogener Hauttransplantation in immunkompetenten Empfängertieren nur in geringem Umfang induziert.

3.3 Das inflammatorische Potenzial *in vitro* differenzierter Th9-Zellen

Um die inflammatorische Potenz von allo-reaktiven Th9-Zellen zu überprüfen, wurden *in vitro* differenzierte C57BL/6 Th9-Zellen durchflusszytometrisch für die Expression von CD44 angereichert und in die Schwanzvene von *recombination activating gene 1*-defizienten (*Rag1*^{-/-}) Mäusen mit C57BL/6-Hintergrund injiziert. Am nächsten Tag erhielten die Tiere ein allogenes Transplantat aus der Schwanzhaut von BALB/c Mäusen. *Rag1*^{-/-} Mäuse besitzen keine reifen B- und T-Zellen, da sie ihre Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor-Gene nicht rekombinieren können (126). Das Transplantatüberleben in diesen immungeschwächten Tieren wird also ausschließlich durch die transferierten Zellen bestimmt. Da Th1-Zellen ein hohes Abstoßungspotenzial aufweisen [zusammengefasst in (127), vgl. **Abb. 3-2D** und **Abb. 3-4**), dienten sie als Positivkontrolle für die akute Transplantatabstoßung.

3.3.1 Effekt auf Transplantatüberleben und Gewicht

Obwohl IL-9-produzierende Th-Zellen unter anderem in Verbindung mit allogener Toleranz erwähnt wurde (84), unterschied sich das Transplantatüberleben zwischen Th9- und Th1-rekonstituierten Tieren nicht (**Abb. 3-5A**). Beide Gruppen stießen ihre Hauttransplantate innerhalb von 13 Tagen ab. **Abb. 3-5B** zeigt beispielhaft zwei nekrotische Transplantate im Vergleich zu einem angewachsenen, intakten Transplantat aus einer nicht-rekonstituierten *Rag1*^{-/-} Maus. Trotz gleicher Transplantatüberlebenszeiten wurden jedoch starke Gewichtsunterschiede zwischen den Versuchsgruppen beobachtet. Während Th9-rekonstituierte Tiere innerhalb von 13 Tagen nach Operation 20 % ihres Gewichts verloren hatten, erlangten Tiere mit Th1-Zellen ihr Ausgangsgewicht in dieser Zeit annähernd wieder (**Abb. 3-5C**, Gewicht bei Versuchsende als % von d0, Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM); Th1: **98,4 \pm 2,9**; Th9: **78,4 \pm 1,5**). Eine Reduktion der injizierten Zellzahl von 2×10^5 auf 1×10^5 hatte keinen Einfluss auf die Th9-vermittelte Gewichtsreduktion (**Abb. 3-5D**; Gewicht bei Versuchsende als % von d0, MW \pm SEM; 2×10^5 : **76,3 \pm 2,0**; 1×10^5 : **81,2 \pm 0,4**). Der Gewichtsverlust konnte durch die Antikörper-vermittelte Neutralisierung von IL-9 aufgehalten werden (**Abb. 3-5E**).

Demzufolge zeigten allogen aktivierte Th9-Zellen *in vivo* inflammatorische Effektorfunktionen, die auf die Produktion von IL-9 zurückzuführen waren. Für polyklonal aktivierte Th9-Zellen war dies bereits bekannt (63).

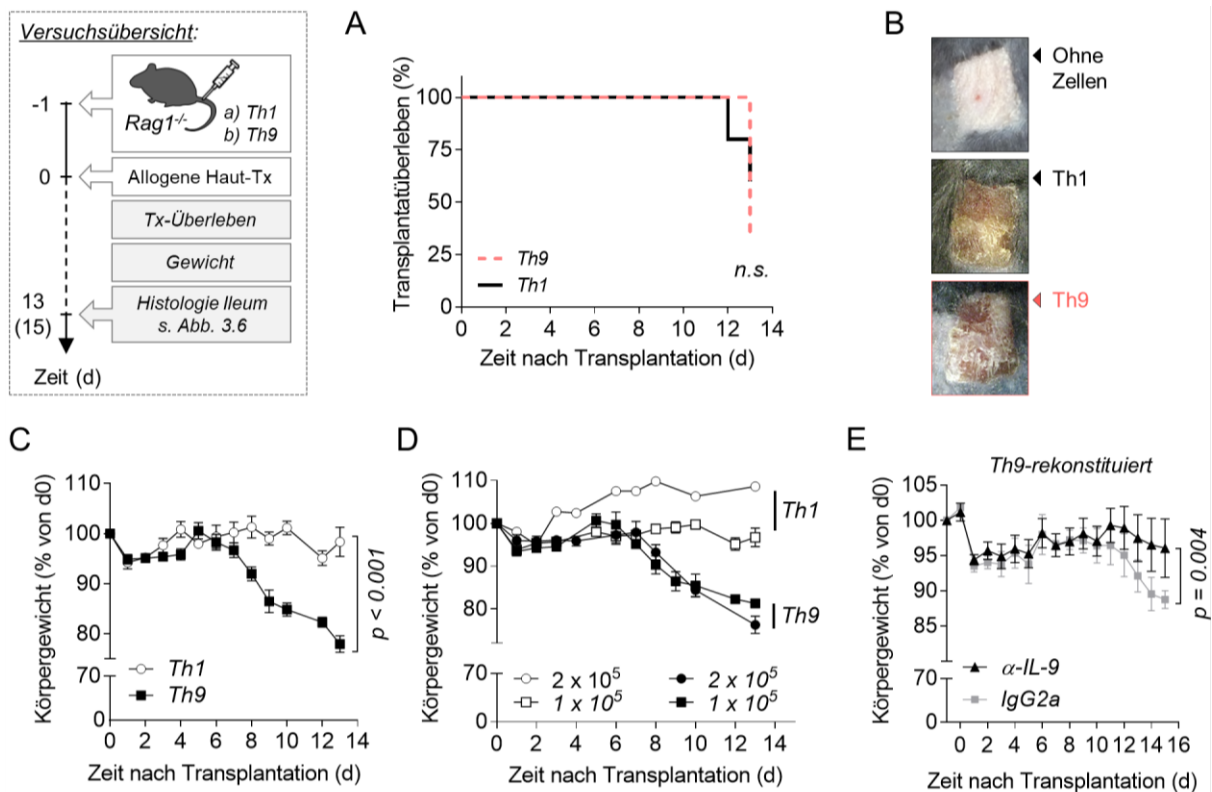


Abb. 3-5. Der Transfer von allo-reaktiven Th9-Zellen in immundefiziente *Rag1*^{-/-} Mäuse verursacht die Abstoßung allogener Transplantate und Gewichtsverlust. Versuchsablauf: C57BL/6 *Rag1*^{-/-} Mäuse erhielten 1 bzw. 2 × 10⁵ aktivierte (CD44⁺) T-Zellen aus *in vitro* differenzierten allo-reaktiven C57BL/6 Th1- (n = 5) oder Th9- (n = 7) Kulturen sowie ein allogenes Hauttransplantat von BALB/c Mäusen. (A) Überleben der BALB/c Spenderhaut, ein Log-Rank-Test wurde verwendet. (B) Zustand repräsentativer Transplantate 13 Tage nach Operation. (C) Gewichtsverlauf von *Rag1*^{-/-} Empfängertieren als MW ± SEM. (D) Gewichtsvergleich nach Erhalt von 1 oder 2 × 10⁵ Zellen (n = 2 – 4 pro Gruppe, MW ± SEM). (E) Th9-rekonstituierte *Rag1*^{-/-} oder *Rag2*^{-/-} Mäuse erhielten an den Tagen -1, 0, 1, 3 und 5 relativ zum Transplantationszeitpunkt intraperitoneal je 100 µg eines anti-IL-9- (α-IL-9, n = 4) oder Isotypkontroll-Antikörpers (IgG2a, n = 3). Der Gewichtsverlauf ist als MW ± SEM dargestellt. Für die statistische Analyse in C und E wurde ein lineares gemischtes Modell an die Gewichtsdaten angepasst. Der p-Wert des Interaktionsterms (Gruppe mit Zeit) wurde dann mittels ANOVA-Typ-III-Test berechnet. Tx, Transplantation; MW, Mittelwert; SEM standard error of the mean; n. s., nicht signifikant (p > 0.05).

3.3.2 Th9-vermittelte Darmentzündung

Es ist bekannt, dass der Transfer von T-Zellen in immundefiziente Mäuse zur Ausbildung einer chronischen Colitis führen kann (128). Um zu überprüfen, ob der akute Gewichtsverlust auf eine Darmentzündung zurückzuführen war, wurden Dünndarmproben aus Th1- und Th9-rekonstituierten Tieren entnommen und histologisch untersucht.

Zwischen Th1- und Th9-rekonstituierten Tieren zeigten sich große Unterschiede in der Morphologie der Schleimhaut (Mukosa). Während die Darmzotten (Villi) in Th9-rekonstituierten Tieren deutlich verkürzt und verbreitert waren, glich die Mukosa von Th1-behandelten Tieren der Mukosa nicht-rekonstituierter Kontrolltiere (Abb. 3-6A). Die Zottenverkürzung wurde quantifiziert, indem das Verhältnis von Villus-Höhe zur Krypten-Tiefe bestimmt wurde. Dieses war in Th9-behandelten Tieren gegenüber Th1-rekonstituierten Tieren signifikant vermindert (Abb. 3-6B, \bar{x} [IQS]; Th9: 2,8 [2,5 – 3,3]; Th1: 3,6 [3,1 – 4,1]). Aus

diesen Daten wurde geschlussfolgert, dass Th9-rekonstituierte Tiere eine Darmentzündung entwickelt hatten.

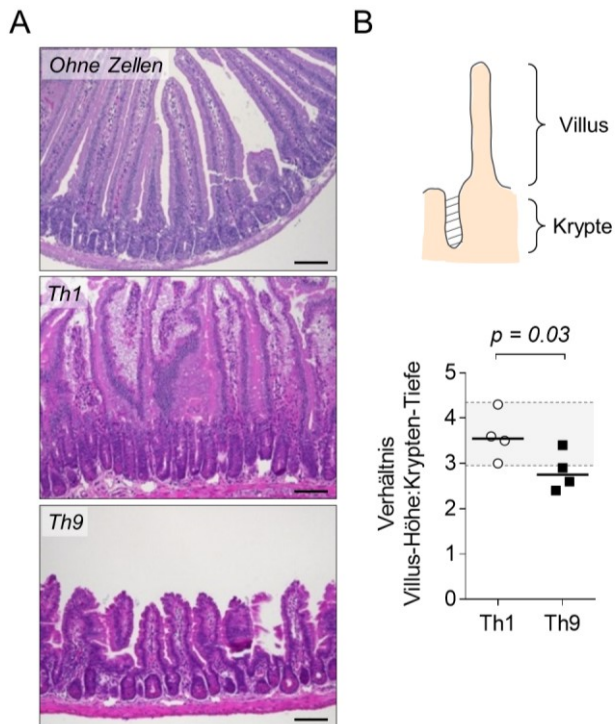


Abb. 3-6. Im Gegensatz zu Th1-Zellen verursacht der Transfer von Th9-Zellen in *Rag1*^{-/-} Mäusen eine intestinale Entzündung. Versuchsablauf s. Abb. 3-5. (A) Repräsentative Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Ileumschnitte aus *Rag1*^{-/-} Mäusen ohne Zellinjektion oder nach Injektion allo-reaktiver Th1- bzw. Th9-Zellen. Die Proben wurden 12 (ohne Zellen) bzw. 13 (Th1, Th9) Tage nach allogener Hauttransplantation entnommen. Maßstab, 100 µm. (B) Schematische Darstellung der Mukosa mit Villus und Krypte sowie Verhältnis von Villus-Höhe zu Krypten-Tiefe in der ilealen Mukosa mit Median. Grau kennzeichnet den Bereich, in dem sich die mittleren 50 % der Werte aus nicht-rekonstituierten Kontrolltieren befanden. Die statistische Analyse erfolgte mit einem einseitigen Mann-Whitney-Test.

3.4 Phänotypische Charakterisierung *in vitro* differenzierter Th9-Zellen

3.4.1 Einzigartiger Aktivierungsphänotyp

Das erhöhte inflammatorische Potenzial von Th9-Zellen hätte neben der IL-9-Produktion auch auf eine veränderte Expression funktioneller Oberflächenmoleküle zurückzuführen sein können. Um potenzielle Unterschiede zwischen den applizierten Zellpopulationen aufzudecken, wurden aktivierte (CD44⁺) T-Zellen (CD3⁺TZR-β⁺) durchflusszytometrisch aus Th0-, Th1- und Th9-polarisierten Ko-Kulturen angereichert und hinsichtlich der Expression von 84 Genen, deren Genprodukte auf der Zelloberfläche exprimiert werden, untersucht. Dafür wurde ein handelsüblicher Genexpressionsarray verwendet.

Für 31 der 84 Gene wurde eine Varianz (s^2) > 0,5 und damit eine differenzielle Expression beobachtet. Eine für diese Gene durchgeführte Cluster-Analyse zeigte, dass sich die Expressionsmuster von unpolarisierten und Th1-polarisierten Zellen stark ähnelten und sich deutlich vom Profil der Th9-Zellen abhoben (Abb. 3-7A). Gene, die in Th9-Zellen im Vergleich zu Th0- und Th1-Zellen herunterreguliert waren, sind in der Abbildung durch das Kästchen I markiert, während heraufregulierte Gene durch Kästchen II gekennzeichnet sind. Auffällig war, dass viele der differenziell exprimierten Gene eine Rolle bei der T-Zellaktivierung spielen z. B. *Cd40lg*, *Dpp4* (CD26), *Cd96*, *Ctla4*, *Cd83* und *Cd38*. Dabei war die Expression von *Cd40lg*, *Dpp4* und *Cd96* in Th9-Zellen verglichen mit Th0/Th1-Zellen geringer, wohingegen *Ctla4*, *Cd83* und *Cd38* höher exprimiert waren (Abb. 3-7A und Tab. 3-1).

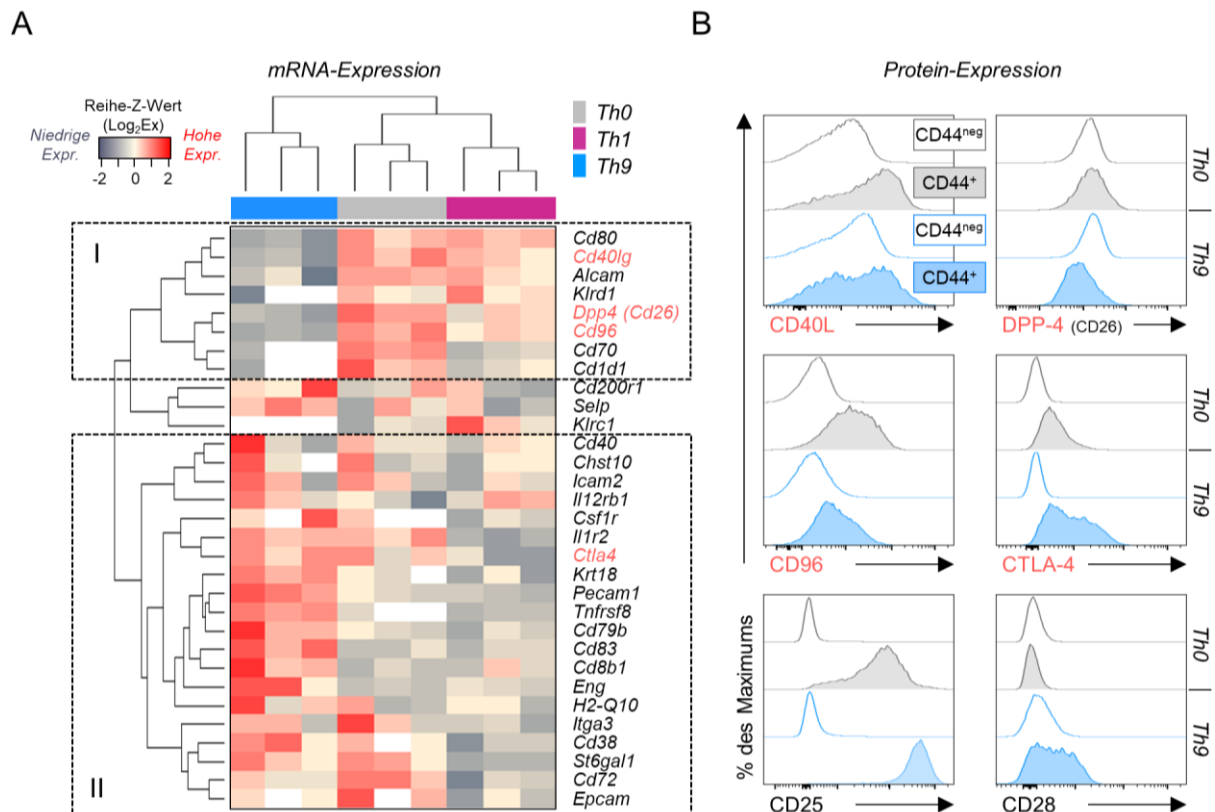


Abb. 3-7. In vitro differenzierte Th9-Zellen zeigen eine differenzielle Expression aktivierungsassoziierter Moleküle. (A) Nicht-supervidierte hierarchische Cluster-Analyse von differenziell regulierten ($s^2 > 0,5$) zelloberflächen-exprimierten Genen in unpolarisierten (Th0), Th1- und Th9-polarisierten allo-reaktiven C57BL/6 T-Zellen. Die Expression aus je drei unabhängigen Ko-Kulturen wurde mithilfe eines Genexpressionsarrays bestimmt und ist relativ zur Expression des Referenzgenes *B2m* dargestellt. Die Kästchen I und II kennzeichnen Gene, die in Th9-Zellen herunter- bzw. heraufreguliert waren. Weiße Flächen markieren Werte unterhalb der Nachweisgrenze ($Ct > 35$). Für rot geschriebene Gene liegen Daten zur Proteinexpression vor (s. Abb. 3-7B). (B) Die exemplarischen Histogramme zeigen Proteine, deren Expression aktivierungsabhängig reguliert wurden. Gezeigt ist die Oberflächenexpression jeweils für nicht-aktivierte (CD44^{neg}) und aktivierte (CD44⁺) allo-reaktive BALB/c T-Zellen aus Th0- und Th9-polarisierten Ko-Kulturen. Für alle Proteine erfolgte die Messung nach Restimulation mit PMA und Ionomycin. *B2m*, β 2-Mikroglobulin, Ct, *threshold cycle*, Expr, Expression.

Auch auf Proteinebene – hier aufgrund der transkriptionellen Ähnlichkeit von Th1- und Th0-Zellen nur mit Th0 verglichen – war die Expression der exemplarisch ausgewählten Moleküle CD40L, DPP4 und CD96 in CD44⁺ Th9 Zellen geringer als in CD44⁺ Th0-Zellen, während der ko-inhibitorische Rezeptor CTLA-4 verstärkt exprimiert wurde (Abb. 3-7B). Der Vergleich von aktivierten CD44⁺ und nicht-aktivierten CD44^{neg} Zellen verdeutlicht die aktivierungsabhängige Expression der untersuchten Moleküle. Darüber hinaus exprimierten CD44⁺ Th9-Zellen auch in hohem Maße die α -Kette des IL-2-Rezeptors (IL-2RA, CD25) und regulierten die Expression des ko-stimulierenden Rezeptors CD28 nach Aktivierung nicht, wie in Th0-Zellen, herunter. Auf mRNA-Ebene war die Expression von *Cd28* und *Il2ra* jedoch nicht differenziell reguliert (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigten, dass der Aktivierungsphänotyp von Th9-Zellen im Vergleich zu unpolarisierten und Th1-polarisierten allo-reaktiven T-Zellen einzigartig war.

Tab. 3-1. Differenzielle Genexpression in unpolarisierten (Th0), Th1- und Th9-polarisierten allo-reaktiven T-Zellen. Die Tabelle listet Gene auf, für die eine Varianz (s^2) > 0,5 über alle Datenpunkte (Gruppen) ermittelt wurde. Die x-fache Regulierung ist als Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten angegeben, die p-Werte wurden mit einem ungepaarten t-Test berechnet. Grau hinterlegte Gene finden im Text besondere Erwähnung.

Gen	Th1 vs. Th0		Th9 vs. Th0		Th9 vs. Th1	
	Regulierung (x-fach)	p-Wert	Regulierung (x-fach)	p-Wert	Regulierung (x-fach)	p-Wert
<i>Cd80</i>	-1,06	0,740	-6,56	0,017	-6,19	0,003
<i>Cd40lg</i>	-1,39	0,195	-3,65	0,012	-2,62	0,012
<i>Alcam</i>	-1,28	0,126	-2,57	0,008	-2,01	0,068
<i>Klrd1</i>	1,28	0,500	-5,41	0,019	-6,91	0,045
<i>Dpp4</i>	-1,78	0,040	-3,70	0,005	-2,08	0,015
<i>Cd96</i>	-1,94	0,022	-5,56	0,003	-2,87	0,001
<i>Cd70</i>	-5,84	0,005	-11,37	0,003	-1,95	0,056
<i>Cd1d1</i>	-2,00	0,104	-2,28	0,094	-1,14	0,038
<i>Cd200r1</i>	-1,37	0,579	1,65	0,382	2,26	0,271
<i>Selp</i>	-1,44	0,652	2,56	0,216	3,69	0,102
<i>Klrc1</i>	2,26	0,195	-1,03	0,978	-2,32	0,204
<i>Cd40</i>	-1,14	0,582	1,05	0,642	1,20	0,546
<i>Chst10</i>	-1,30	0,505	-1,22	0,950	1,07	0,598
<i>Icam2</i>	-1,52	0,320	-1,02	0,893	1,50	0,360
<i>Il12rb1</i>	2,07	0,103	2,14	0,132	1,04	0,874
<i>Csf1r</i>	-1,61	0,165	1,69	0,206	2,73	0,062
<i>Il1r2</i>	-3,72	0,009	1,10	0,683	4,08	0,002
<i>Ctla4</i>	-2,55	0,100	1,38	0,397	3,51	0,017
<i>Krt18</i>	-1,42	0,576	4,26	0,009	6,06	0,007
<i>Pecam1</i>	-1,62	0,161	5,63	0,040	9,15	0,031
<i>Tnfrsf8</i>	-1,28	0,492	51,60	0,032	65,96	0,031
<i>Cd79b</i>	-1,42	0,418	5,33	0,169	7,57	0,154
<i>Cd83</i>	-1,06	0,815	3,31	0,027	3,50	0,025
<i>Cd8b1</i>	1,26	0,353	2,56	0,106	2,04	0,170
<i>Eng</i>	1,18	0,176	2,78	0,062	2,36	0,082
<i>H2-Q10</i>	1,04	0,795	2,36	0,378	2,27	0,303
<i>Itga3</i>	-2,13	0,213	-1,29	0,518	1,65	0,142
<i>Cd38</i>	-2,03	0,171	1,99	0,207	4,03	0,078
<i>St6gal1</i>	-2,62	0,026	-1,04	0,897	2,53	0,034
<i>Cd72</i>	-3,33	0,013	-1,89	0,035	1,76	0,136
<i>Epcam</i>	-2,53	0,136	-1,39	0,359	1,83	0,079

3.4.2 Expression Treg-spezifischer Moleküle

Wie im vorherigen Abschnitt sowie in **Abb. 3-8A** gezeigt, exprimierten allo-reaktive Th9-Zellen CTLA-4 und waren stark positiv für CD25. Sie zeigten damit phänotypische Ähnlichkeiten zu CD4⁺Foxp3⁺ Treg-Zellen, die ebenfalls durch die konstitutive Expression beider Moleküle charakterisiert sind. Ferner ist bekannt, dass TGF- β (in Abwesenheit von IL-4) in naiven CD4⁺CD25^{neg} Zellen die Expression von Foxp3 induzieren kann (29).

Zur Aufdeckung weiterer Ähnlichkeiten zwischen Th9- und Treg-Zellen wurde die Expression der Transkriptionsfaktoren Foxp3 und Helios sowie des Oberflächenmoleküls Neuropilin-1 (Nrp-1) bestimmt. Während der Master-Regulator Foxp3 von allen Treg-Zellen exprimiert wird, beschränkt sich die Expression von Helios auf Zellen mit erhöhter suppressiver Aktivität (129).

Nrp-1 wird nicht spezifisch von humanen (130), dafür aber von den meisten murinen regulatorischen T-Zellen exprimiert und ist ebenfalls mit einer erhöhten Suppressorfunktion und Foxp3-Expression verknüpft (131).

In allo-reaktiven Th9-Zellen wurde nahezu keine Ko-Expression von IL-9 mit Foxp3, Helios oder Nrp-1 erfasst (**Abb. 3-8B**). Ursächlich für die hohe Frequenz an Foxp3⁺IL-9^{neg} Zellen in diesem Versuch war die Verwendung der CD4⁺-Gesamtheit für die Kultur, da diese im Thymus entstandene Treg-Zellen enthält. In Kulturen mit naiven T-Zellen war die Foxp3-Expression kaum detektierbar (vgl. **Abb. 3-12B**). Demzufolge beschränkte sich die Ähnlichkeit zwischen Th9- und Treg-Zellen auf die Expression von CD25 und CTLA-4.

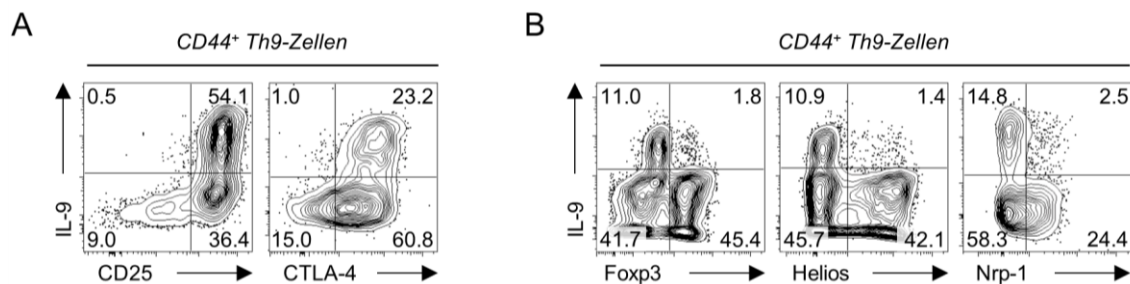


Abb. 3-8. Keine Ko-Expression von IL-9 und den Treg-spezifischen Markern Foxp3, Helios und Nrp-1 in allo-reaktiven Th9-Zellen. Intrazelluläre Expression von IL-9, CTLA-4, Foxp3 und Helios sowie Oberflächenexpression von CD25 und Nrp-1 in allo-reaktiven (CD44⁺) BALB/c Th9-Zellen. Die Ko-Kulturen wurden mit (A) naiven oder (B) Gesamt-CD4⁺ T-Zellen gestartet und sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängige Experimente. CTLA-4, *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*; Foxp3, *Forkhead-Box-Protein 3*; Nrp-1, *Neuropilin-1*.

3.5 Die Heterogenität *in vitro* differenzierter Th9-Zellen

Die bisherigen Versuche hatten gezeigt, dass allo-reaktive (CD44⁺) Th9-Zellen in ihrer Gesamtheit einen inflammatorischen Charakter besaßen (s. Abschnitt 3.3). Diese Beobachtung stand jedoch im Widerspruch zu ihrer anti-inflammatorischen Wirkung im Rahmen der Mastzell-vermittelten Toleranz gegenüber allogenen Hauttransplantaten (84). Daher wurde die Hypothese formuliert, dass sich Th9-Zellen aus Subpopulationen mit unterschiedlichem inflammatorischen Potenzial zusammensetzen könnten.

3.5.1 Heterogene Expression von IL-4

Um Mediatoren einer funktionellen Heterogenität aufzudecken, wurde zunächst untersucht, ob Th9-Zellen neben IL-9 noch weitere Zytokine produzieren konnten. Interessanterweise zeichnete sich ein Teil der IL-9⁺ Zellen durch die Ko-Produktion von IL-4 aus (**Abb. 3-9**, % IL-4⁺IL-9⁺ in CD4⁺CD44⁺ Zellen als \bar{x} [IQS]: **6,9** [5,0 – 9,3]). Dieser Befund war unerwartet, denn verschiedene Studien hatten explizit die *fehlende* Ko-Produktion von Th1- (IFN- γ), Th2- (IL-4) und Th17- (IL-17) assoziierten Molekülen berichtet (62, 63). IFN- γ ⁺IL-9⁺ Zellen wurden dagegen nicht detektiert (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung lieferte erstmals einen konkreten Hinweis für eine funktionelle Heterogenität von Th9-Zellen.

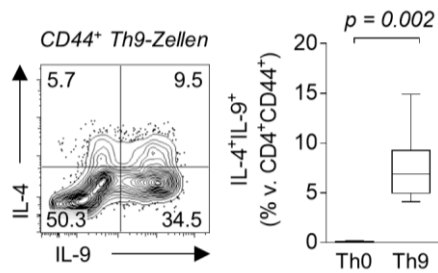


Abb. 3-9. Allo-reaktive Th9-Zellen zeigen heterogene IL-4-Expression. Intrazelluläre Expression von IL-4 und IL-9 in *in vitro* differenzierten allo-reaktiven (CD44⁺) BALB/c Th9-Zellen bzw. in unpolarisierten Zellen (Th0). Der p-Wert wurde mit einem einseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test bestimmt.

3.5.2 Weitere Untersuchung von IL-4⁺IL-9⁺ und IL-4^{neg}IL-9⁺ Th9-Zellen

Um weitere Unterschiede zwischen den Th9-Fractionen mit differenzieller Zytokinexpression aufzudecken, wurden IL-4⁺IL-9^{neg} (IL-4), IL-4⁺IL-9⁺ (doppelt-positiv, DP), IL-4^{neg}IL-9⁺ (IL-9) und IL-4^{neg}IL-9^{neg} (doppelt-negativ, DN) Zellen aus intrazellulär gefärbten *in vitro* differenzierten Th9-Kulturen durchflusszytometrisch sortiert und hinsichtlich ihrer Genexpression untersucht. Für die RNA-Extraktion wurde ein kommerzielles Versuchssystem verwendet, das speziell für Formaldehyd-fixiertes und in Paraffin eingebettetes (*formaldehyde-fixed paraffin-embedded*, FFPE) Gewebe konzipiert wurde. Dies war notwendig, da ein Formaldehyd-basierter Fixierungsschritt bei der intrazellulären Zytokinfärbung die Vernetzung von Nukleinsäuren und Proteinen zur Folge hatte. Die RNA-Menge, die pro 1×10^5 Zellen isoliert wurde, sowie deren Qualität ist **Tab. 3-2** zu entnehmen. Anschließend wurde die Genexpression von oberflächlich exprimierten Proteinen mit dem bereits vorgestellten Genexpressionsarray (vgl. Abschnitt 3.4.1) bestimmt.

Tab. 3-2. Ausbeute und Reinheit von RNA aus Formaldehyd-fixierten Zellen (RNeasy FFPE Kit, Qiagen). Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

Probe	RNA Ausbeute (pg pro 1×10^5 Zellen)	A260/A280	A260/A230
DN	128 \pm 88	1,8 \pm 0,2	1,7 \pm 0,4
IL-9	215 \pm 57	1,9 \pm 0,1	1,7 \pm 0,3
IL-4	473 \pm 380	1,6 \pm 0,1	1,1 \pm 0,3

A260/A280: Kontamination mit Proteinen

A260/A230: Kontamination mit aromatischen Verbindungen

Für die Reinheit nach Zellsortierung wurde ein Grenzwert von 90 % festgelegt. Da sich die IL-4-produzierenden Populationen (IL-4⁺IL-9^{neg} und IL-4⁺IL-9⁺) nicht klar von den übrigen Zellen abgrenzten, musste bei der Zellsortierung insbesondere für die doppelt-positive Zielpopulationen eine sehr strikte Eingrenzung (*gaten*) erfolgen. Aus diesem Grund konnten nur sehr wenig IL-4⁺ Zellen sortiert werden, sodass die RNA aus drei unabhängigen Ko-Kulturen für die Bestimmung der Genexpression vereint werden musste. Bei den IL-4⁺IL-9⁺ Zellen war die RNA-Menge trotz Vereinigung nicht ausreichend, um die Genexpression bestimmen zu können. Entgegen der ursprünglichen Versuchsidee konnten also nur IL-4⁺, IL-9^{neg} und DN-Zellen verglichen werden.

Zwischen IL-4⁺, IL-9^{neg} und DN-Zellen wurden 20 der 84 gemessenen Gene differenziell ($s^2 > 1$) exprimiert (Abb. 3-10). In der Cluster-Analyse gruppieren sich zwei der drei IL-9-Proben separat von den übrigen Proben. Die Expressionsprofile von IL-4- und DN-Zellen waren dagegen ähnlich, sodass sich die Proben in der Analyse nicht separierten. Gene, die zur Cluster-Bildung beitrugen, waren *Cd6*, und erneut *Cd83*, *Ctla4*, *Cd25* und *Cd28*, die von IL-9⁺ Zellen stärker exprimiert wurden.

Obwohl die initiale Fragestellung mit diesem Experiment nicht beantwortet werden konnte, deutete die fehlende Gruppierung aller IL-9⁺ sowie aller DN-Proben erneut eine heterogene Genexpression in den Proben an.

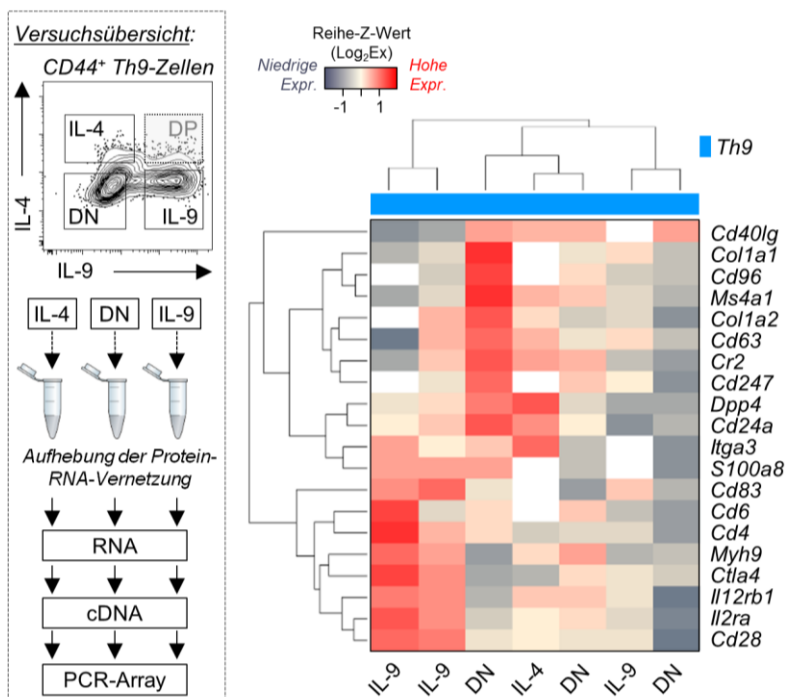


Abb. 3-10. Heterogene Genexpression in allo-reaktiven Th9-Zellen.

Versuchsablauf: In vitro differenzierte allo-reaktive BALB/c Th9-Zellen wurden in IL-4⁺IL-9^{neg} (IL-4), IL-4^{neg}IL-9⁺ (IL-9) und IL-4^{neg}IL-9^{neg} (doppelt-negativ, DN) Zellen sortiert. Die Fixierung der Zellen wurde aufgehoben und RNA isoliert. Nach reverser Transkription in cDNA wurde die Genexpression von Zelloberflächenproteinen mittels Genexpressionsarray bestimmt. Die heatmap zeigt eine nicht-supervidierte hierarchische Cluster-Analyse von differenziell ($s^2 > 1$) exprimierten Genen aus drei unabhängigen Ko-Kulturen. Aufgrund der geringen RNA-Ausbeute wurden die IL-4-Proben vor der Messung vereint. Werte unterhalb der Nachweisgrenze ($Ct > 35$) sind weiß dargestellt. Ct , threshold cycle; Expr., Expression.

3.5.3 Genexpression auf Einzelzell-Ebene

Genexpressionsstudien in Zellpopulationen bilden das mittlere Expressionslevel aller Zellen ab. Die Expression zwischen einzelnen Zellen innerhalb einer Population kann jedoch erheblich variieren [(132) und zusammengefasst in (133)] und wird mit diesen Analysen nicht erfasst. Daher erfordert die Untersuchung von potenziell heterogenen Zellpopulationen wie z. B. allo-reaktiven Th9-Zellen die Analyse auf Einzelzellebene.

a. Einzelzell-Analyse mit dem C1-System von Fluidigm

Für die Einzelzell-Genexpressionsanalyse von CD44⁺ Zellen aus allo-reaktiven unpolarisierten (Th0), Th1- und Th9-polarisierten Ko-Kulturen wurde das 2012 eingeführte C1-System von Fluidigm verwendet. Die Methode basiert auf der Verwendung eines sog. *integrated fluidic circuits*- (IFC-)Chip und realisiert in einem automatisierten Prozess die Vereinzelung der Zellen, deren Lyse sowie die reverse Transkription der RNA in cDNA. Nach einem Präamplifizierungsschritt kann dann die Expression z. B. mittels quantitativer Echtzeit-PCR bestimmt werden (schematische Versuchsübersicht s. **Abb. 3-11A**).

Auf einem IFC-Chip befinden sich 96 Einheiten zur Zellvereinzelung, die sog. *capture sites* (**Abb. 3-11B**). Die Stelle, in der die Zelle zurückgehalten wird, wird als Nest bezeichnet. Derzeit sind drei Chips mit verschiedenen Nestgrößen erhältlich. Sie ermöglichen die optimale Erfassung von Zellen, deren Durchmesser in den Bereichen 5 – 10 µm, 10 – 17 µm oder 17 – 25 µm liegt. Um einen geeigneten Chip auswählen zu können wurde die Größe von frischen, allo-reaktiven T-Zellen ermittelt und mit der Größe von Zellen verglichen, die bei – 80 °C gelagerte wurden. **Abb. 3-11C** zeigt, dass frische allo-reaktive Th9-Zellen eine Größe von $11,0 \mu\text{m} \pm 2,0 \mu\text{m}$ (MW \pm Standardabweichung, SD) besaßen und damit optimal von dem mittleren IFC-Chip (10 – 17 µm) erfasst wurden. Aufgetaute Zellen hatten dagegen nur eine Größe von $9,6 \mu\text{m} \pm 2,0 \mu\text{m}$, sodass der Chip zur Erfassung von kleinen Zellen (5 – 10 µm) in Frage kam. Um die maximale Vergleichbarkeit bei der Probenaufarbeitung zu gewährleisten, wurden daher alle C1-Experimente mit frischen Zellen und dem 10 – 17 µm IFC-Chip durchgeführt.

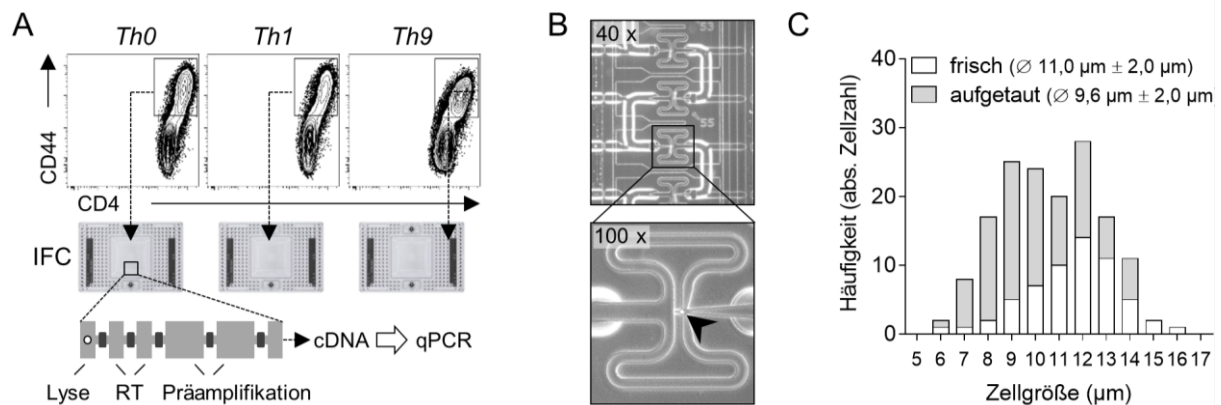


Abb. 3-11. Einzelzell-Genexpressionsanalyse mit dem C1-System. (A) Methodik: CD44⁺ Zellen aus unpolarisierten (Th0), Th1- und Th9-polarisierten allo-reaktiven BALB/c Ko-Kulturen wurden mit dem IFC-Chip-basierten C1 Single-Cell Auto Prep System vereinzelt. In separaten Reaktionskammern erfolgten dann Zelllyse, reverse Transkription (RT) der RNA in cDNA und eine genspezifische Präamplifizierung. Anschließend wurde die Genexpression in einer quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) ermittelt. (B) Ausschnitt eines IFC-Chips mit mehreren *capture sites*. Die 100-fache Vergrößerung zeigt eine *capture site* mit einer vereinzelt Zelle im Nest (Pfeilspitze). (C) Gegenüberstellung der Zellgrößenverteilung von frischen (n = 59) und aufgetauten (n = 96) allo-reaktiven (CD44⁺) BALB/c Th9-Zellen (MW \pm SD). IFC, *integrated fluidic circuit*; PCR, Polymerase-Kettenreaktion; MW, Mittelwert; SD, *standard deviation*.

Insgesamt wurde die Expression von 48 Genen (inkl. einer RNA *spike-in*-Kontrolle und zwei Referenzgenen) bestimmt. Die Liste der Gene beinhaltete neben interessanten Kandidaten aus den Genexpressionsarray-Versuchen (s. Abschnitt 3.4.1) verschiedene Th-spezifische Zytokine

und Transkriptionsfaktoren. Zudem wurde die Expression von Zytokin- und Chemokinrezeptoren und weiteren Aktivierungs- und Differenzierungsmarkern bestimmt (s. **Tab. 3-3**).

Tab. 3-3. Auflistung der 48 Gene, deren Expression auf Einzelzell-Ebene bestimmt wurde.

Gruppe	Gene
Zytokine	<i>Ifng, Il4, Il5, Il9, Il10, Il13, Il17a, Il22</i>
Transkriptionsfaktoren	<i>Foxp3, Gata3, Irf4, Rorc, Spi1</i> (PU.1), <i>Tbx21</i> ,
Zytokinrezeptoren	<i>Il1r1, Il1r2, Il1rl1</i> (T1/ST2), <i>Il4ra, Il9r, Tgfbr1, Tgfbr2, Tgfbr3</i>
Chemokinrezeptoren	<i>Ccr3, Ccr4, Ccr6, Cxcr3</i>
Aktivierungs- und Differenzierungsmarker	<i>Cd28, Cd38, Cd40lg, Cd83, Cd96, Cd200r1, Ctla4, Dpp4</i> (CD26), <i>Fas, Il2ra</i> (CD25), <i>Il7r, Itgae</i> (CD103), <i>Klrg1, Ms4a1</i> (CD20), <i>Nrp1, Pdcad1</i> (PD-1), <i>Sell</i> (CD62L), <i>Tcaim, Tnfrsf9</i> (4-1BB)
Referenzgene	<i>B2m, Hpvt</i>
Kontrolle	RNA <i>spike-in</i>

b. Zwei Th9-Subpopulationen mit unterschiedlicher CD96-Expression

Aus unpolarisierten (Th0), Th1- und Th9-polarisierten allo-reaktiven Ko-Kulturen wurden CD44⁺ T-Zellen angereichert und vereinzelt. Theoretisch ist eine Vereinzelung von 96 Zellen pro Chip möglich. Bei der lichtmikroskopischen Inspektion des Chips wurden jedoch auch Nester identifiziert, die mit Zelldebris oder einer Zellzahl > 1 gefüllt waren. Diese wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die Anzahl der tatsächlich vereinzelter Zellen pro Chip betrug $47,7 \pm 9,4$ (n = 6, MW \pm SD).

Für die Auswertung der Genexpression wurden 280 Zellen (Th0, n = 100; Th1, n = 67; Th9, n = 113) aus je zwei verschiedenen Ko-Kulturen eingeschlossen. In der Hauptkomponentenanalyse gruppieren sich nahezu alle Th9-Zellen separat von Th0- und Th1-Zellen (**Abb. 3-12A**). Das Transkriptionsprofil von Th0- und Th1-Zellen war, wie in den Untersuchungen zuvor, vergleichbar und daher überlappend. Von den 48 (bzw. 47 ohne RNA *spike-in*-Kontrolle) ausgewählten Genen wurden 36 von den Zellen exprimiert. Interessanterweise wurde *Il9* von nahezu *allen* Th9-Zellen transkribiert (**Abb. 3-12B und C**), obwohl nur etwa 60 % der Th9-Zellen das zugehörige Protein produzierten (vgl. **Abb. 3-2A**, % IL-9⁺ in CD4⁺CD44⁺ als \bar{x} [IQS]; **62,3** [49,3 – 68,4]). Dagegen war die *Il9*-Expression in Th0- und Th1-Zellen nicht detektierbar, was maßgeblich zur Separation der Th9-Zellen in der Cluster-Analyse beitrug. Weiterhin wurden die Gene *Il2ra* (kodiert CD25), *Cd83*, *Il4ra*, *Gata3*, *Il1r1*, *Ccr4* und *Cd28* (**Abb. 3-12C**) stark differenziell exprimiert, wobei Th9-Zellen jeweils die höchsten Expressionslevel aufwiesen.

Eine Cluster-Analyse innerhalb der Th9-Zellen führte zur Identifizierung einer Subpopulation mit besonders hoher Expression von *Dpp4* (*Cd26*), *Fas*, *Il4*, *Il5*, *Il7r* (kodiert für CD127), *Ctla4*, *Cd28* und *Cd25* (s. eingezeichneter Kasten in **Abb. 3-12D**). Fast allen Zellen dieser Population war eine hohe *Cd96*-Expression gemein, während die restlichen Th9-Zellen *Cd96* nur schwach exprimierten. Die heterogene CD96-Expression in Th9-Zellen zeigte sich auch auf Proteinebene (**Abb. 3-12E**). Im Gegensatz dazu besaßen unpolarisierte (Th0) und Th1-polarisierte T-Zellen eine einheitlich hohe CD96-Expression. Offensichtlich existierten innerhalb der Th9-Zellen also zwei Subpopulationen mit differenzieller CD96-Expression (CD96^{low} und CD96^{high}).

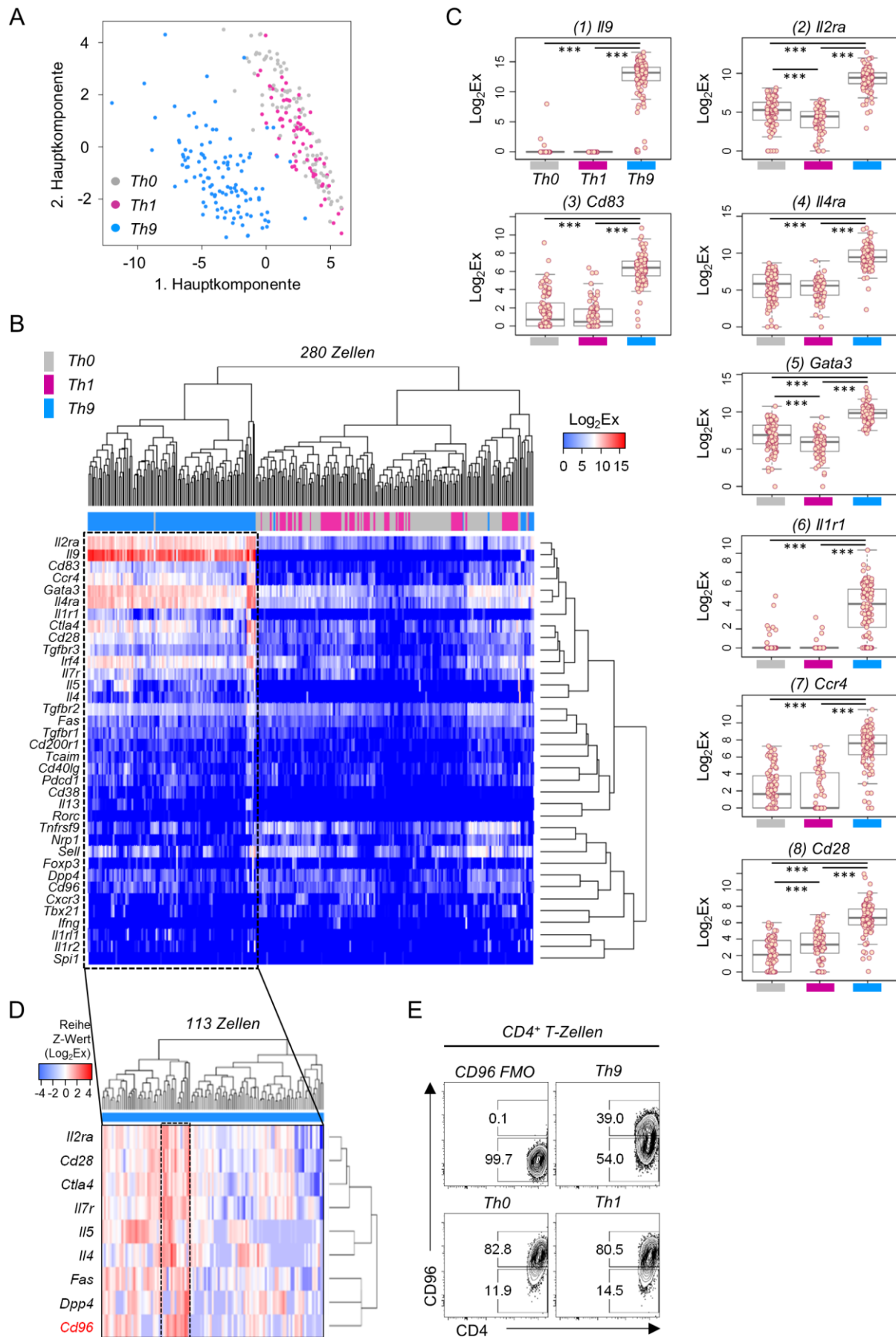


Abb. 3-12. Identifizierung von CD96^{high} und CD96^{low} Th9-Zellen. Erläuterungen s. nächste Seite.

Fortsetzung Abb.3-12.

(A-D) Einzelzell-Genexpressionsanalyse in allo-reaktiven (CD44⁺) T-Zellen aus je zwei unabhängigen unpolarisierten (Th0, n = 100), Th1- (n = 67) und Th9- (n = 113) polarisierten BALB/c Ko-Kulturen. Die Expressionswerte der Referenzgene (*B2m*, *Hprt*) und der RNA *spike-in*-Kontrolle wurden von der Analyse ausgeschlossen. (A) Hauptkomponentenanalyse der Genexpression (skalierte Darstellung). (B) Nicht-supervidierte hierarchische Cluster-Analyse (Pearson-Korrelation) der Genexpression. Die Analyse beinhaltet alle Gene mit detektierbarer Expression (36 von 48). (C) Box-Whisker-Plots differenziell regulierter Gene. Die Nummerierung (1) – (8) entspricht den ansteigenden Bonferroni-korrigierten ANOVA-p-Werten: *Il9* (p = 1.4×10^{-126}), *Il2ra* (p = 1.4×10^{-65}), *Cd83* (p = 7.1×10^{-64}), *Il4ra* (p = 1.2×10^{-52}), *Gata3* (p = 3.6×10^{-47}), *Il1r1* (p = 5.5×10^{-47}), *Ccr4* (p = 2.2×10^{-46}) und *Cd28* (p = 2.3×10^{-43}). Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels *Post hoc* paarweisem t-Test bestimmt. (D) Nicht-supervidierte hierarchische Cluster-Analyse (*complete linkage*-Methode) der Genexpression in Th9-Zellen (n = 113). Das Expressionsmuster der aufgeführten Gene resultierte in der Gruppierung von Zellen mit differenzieller Gen- und insbesondere *Cd96*-Expression (eingezeichneter Kasten). (E) CD96-Oberflächenexpression in allo-reaktiven (CD44⁺) BALB/c T-Zellen inklusive einer Kontrolle, die bis auf für CD96 vollständig gefärbt wurde (*fluorescence minus one*, FMO). Die Färbung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Versuche. Ex, Expression; gMFI, *geometric mean fluorescence intensity*; *B2m*, β 2-Mikroglobulin, *Hprt*, Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase. ***p < 0.001.

3.6 CD96-Expressionskinetik und Charakterisierung von CD96^{high} und CD96^{low} Th9-Zellen

CD96 (bzw. *T cell-activated increased late expression protein*, TACTILE) wird von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie von NK-Zellen exprimiert. Welche Rolle das Molekül bei der Kontrolle von T-Zellantworten einnimmt, ist für CD4⁺ T-Zellen bisher nicht bekannt. In NK-Zellen ist CD96 überwiegend als Rezeptor mit inhibitorischer Wirkung beschrieben (50, 134) wobei ebenso ein aktivierender Einfluss belegt ist (47). Anhand dieser Daten wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Expression von CD96 auch in Th9-Zellen an der Regulierung von Effektorfunktionen beteiligt sein könnte. Um dieser Frage nachzugehen wurde zunächst der zeitliche Verlauf der CD96-Expression in Th0- und Th9-Zellen verglichen. Anschließend wurden CD96^{high} und CD96^{low} Th9-Zellen *in vitro* hinsichtlich der Expression von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren sowie ihrer Stabilität untersucht.

3.6.1 Verlauf der CD96-Expression über die Zeit

Es ist bekannt, dass die Expression von CD96 in T-Zellen erst nach Aktivierung induziert wird. Um eine Vorstellung vom zeitlichen Verlauf der CD96-Expression auch in Hinblick auf die hohe Expression in Th0/Th1 und die niedrige Expression in Th9-Zellen (Abb. 3-12E und F) zu erhalten, wurde die CD96-Expression über einen Zeitraum von fünf Tagen in unpolarisierten (Th0)- und Th9-polarisierten allo-reaktiven Ko-Kulturen bestimmt. Innerhalb der ersten zwei Tage nahm die CD96-Expression in beiden Kulturen konstant und vergleichbar zu, bis die Mehrheit der Zellen CD96 exprimierten (Abb. 3-13). Ab dem dritten Tag nahm die CD96-Expression in Th9-Kulturen rasch ab, während die Expression in unpolarisierten Kulturen erst später und viel langsamer sank. Am letzten Beobachtungstag exprimierten Th9-Zellen nur noch sehr wenig CD96, während die Frequenz an CD96-positiven Zellen in unpolarisierten Ko-Kulturen noch bei 70 % lag. Diese Daten zeigten, dass die Expression von CD96 in Th0- und Th9-Zellen unterschiedlich reguliert wurde.

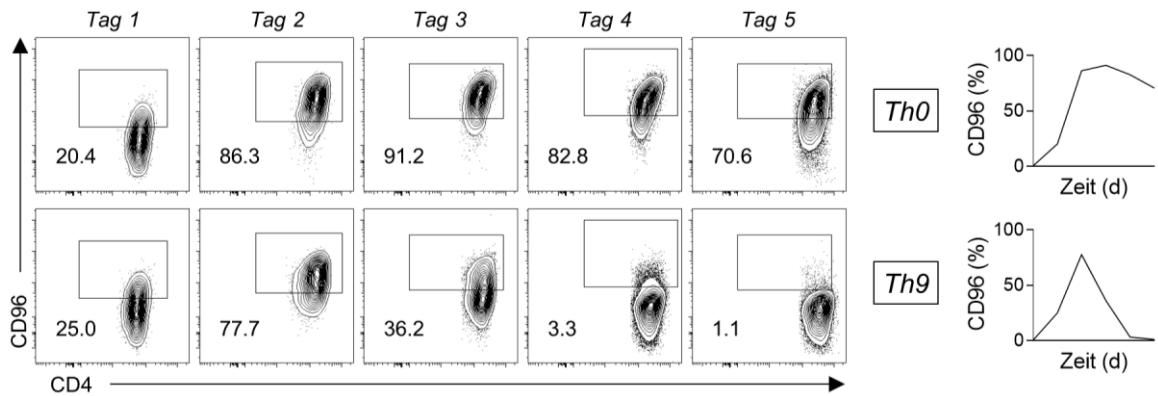


Abb. 3-13. Differenzielle Regulierung der CD96-Expression in allo-reaktiven Th0- und Th9-Zellen. Verlauf der CD96-Expression in *in vitro* differenzierten allo-reaktiven (CD44⁺) C57BL/6 T-Zellen aus unpolarisierten (Th0) oder Th9-polarisierten Ko-Kulturen über eine Zeitspanne von fünf Tagen ($n = 1$). Die Kurven skizzieren den Expressionsverlauf.

3.6.2 Expression von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren

Versuche mit *in vitro* differenzierten allo-reaktiven Th9-Zellen zeigten eine negative Korrelation zwischen der CD96-Expression und der Zytokinproduktion. So war die Frequenz von IL-9⁺ und IL-4⁺IL-9⁺ Zellen in CD96^{high} Th9-Zellen nur halb so hoch wie in CD96^{low} Th9-Zellen (**Abb. 3-14A**; % IL-9⁺ in CD4⁺CD44⁺ als \bar{x} [IQS]; CD96^{high}: **27,0** [21,6 – 35,4]; CD96^{low}: **66,7** [54,5 – 71,4]; % IL-4⁺IL-9⁺ in CD4⁺CD44⁺; CD96^{high}: **1,4** [0,8 – 4,0]; CD96^{low}: **5,3** [1,7 – 5,9]).

Die verminderte IL-9-Produktion in CD96^{high} Th9-Zellen war jedoch kein Ausdruck einer unvollständigen Th9-Differenzierung, denn beide Subpopulationen besaßen – im Gegensatz zu CD44⁺ T-Zellen aus unpolarisierten Ko-Kulturen – hohe *Il9*-mRNA-Expressionslevel und exprimierten die Th9-assoziierten Transkriptionsfaktoren *Irf4* und *Batf* gleich stark (**Abb. 3-14B**). Weiterhin konnten zwischen den Th9-Fraktionen keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen *Spi1* (kodiert für PU.1) und *Stat6* beobachtet werden. Anders als *Irf4* und *Batf* wurden diese jedoch in vergleichbarem Maß von CD44⁺ Th0-Zellen exprimiert. In Übereinstimmung mit den Proteindaten (vgl. **Abb. 3-14A**) zeigte sich die *Il9*-Expression in CD96^{low} Th9-Zellen erneut höher als in CD96^{high} Th9-Zellen.

Bei der Untersuchung weiterer, nicht-Th9-assoziiierter Gene fielen CD96^{low} Th9-Zellen im Vergleich zu CD96^{high} Zellen zudem durch ein höheres *Il4*-Expressionslevel und eine leicht (aber nicht signifikant) erhöhte *Il5*-Transkription auf (**Abb. 3-14C**). Dagegen wurde *transcription factor 7* (*Tcf7*), ein Gen mit vielfältigen Funktionen bei der Regulierung von Th-Zell-Differenzierungsprozessen, stärker von CD96^{high} Th9-Zellen exprimiert. Weiterhin wurde kürzlich publiziert, dass IRF1 der Aktivierung des *Il9*-Promotors durch IRF4 entgegenwirken kann (135). Es zeigte sich jedoch, dass die verminderte *Il9*-Expression in CD96^{high} Th9-Zellen nicht mit einem erhöhten *Irf1*-Expressionslevel verknüpft war. Für die Expression des ko-inhibitorischen Rezeptors *Ctla4* wurden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fraktionen beobachtet.

Zusammenfassend belegten diese Daten (I) einen vergleichbaren Th9-Differenzierungsgrad in beiden Th9-Fraktionen (II) Unterschiede bei der Expression des Transkriptionsfaktors *Tcf7* sowie (III) ein deutlich höheres Potenzial zur Zytokinproduktion in CD96^{low} Th9-Zellen.

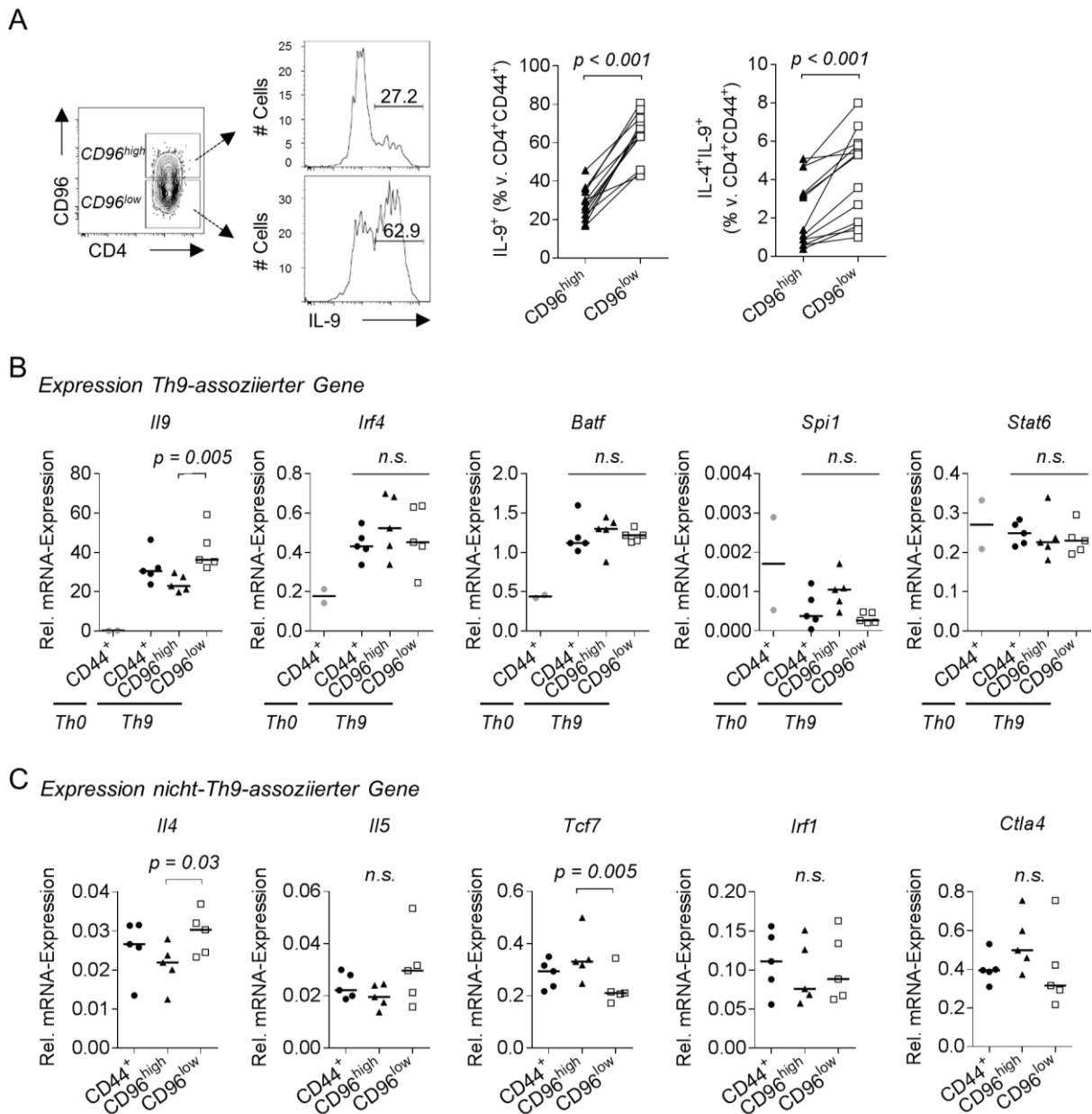


Abb. 3-14. Molekulare Charakterisierung zeigt höhere Zytokinproduktion in CD96^{low} Th9-Zellen. (A) Intrazelluläre Produktion von IL-9 und IL-4 in CD96^{high} und CD96^{low} *in vitro* differenzierten allo-reaktiven C57BL/6 Th9-Zellen (n = 13). Statistische Auswertung mit einseitigem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. (B) mRNA-Expression (relativ zur Expression des Referenzgenes *Hprt*) von *Il9* und Th9-assozierten Transkriptionsfaktoren sowie (C) weiteren Genen in CD96^{high} und CD96^{low} Th9-Zellen, die aus allo-reaktiven C57BL/6 Zellen durchflusszytometrisch sortiert wurden. Es ist der Median eingezeichnet. Die Ergebnisse wurden mit der Expression in nicht-separierten CD44⁺ Th9-Zellen und ggf. in CD44⁺ Zellen aus unpolarisierten Ko-Kulturen (Th0, n = 2) verglichen. Statistische Auswertung der Th9-Datensätze mit Friedman-Test und *post hoc* Dunn-Test. *Hprt*, Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase; n. s., nicht signifikant (p > 0.05).

3.6.3 Stabilität nach Re-Aktivierung

Ob es sich bei $CD96^{\text{high}}$ und $CD96^{\text{low}}$ Th9-Zellen um phänotypisch stabile Zellen oder vielmehr um die Beobachtung eines transienten Phänomens handelte, wurde im folgenden Versuch untersucht. Dazu wurden *in vitro* differenzierte allo-reaktive Th9-Zellen in $CD96^{\text{high}}$ und $CD96^{\text{low}}$ Th9-Zellen sortiert und allogen re-aktiviert. Die durchflusszytometrische Analyse der CD96-Expression ergab, dass beide Populationen über einen Zeitraum von 48 Stunden stabil waren. Danach verloren $CD96^{\text{high}}$ Th9-Zellen ihre CD96-Expression, wobei dies mit einem Anstieg der IL-9-Expression einherging. Trotz Verlust der CD96-Expression blieb die negative Korrelation zwischen CD96-Expression und IL-9-Produktion also stabil.

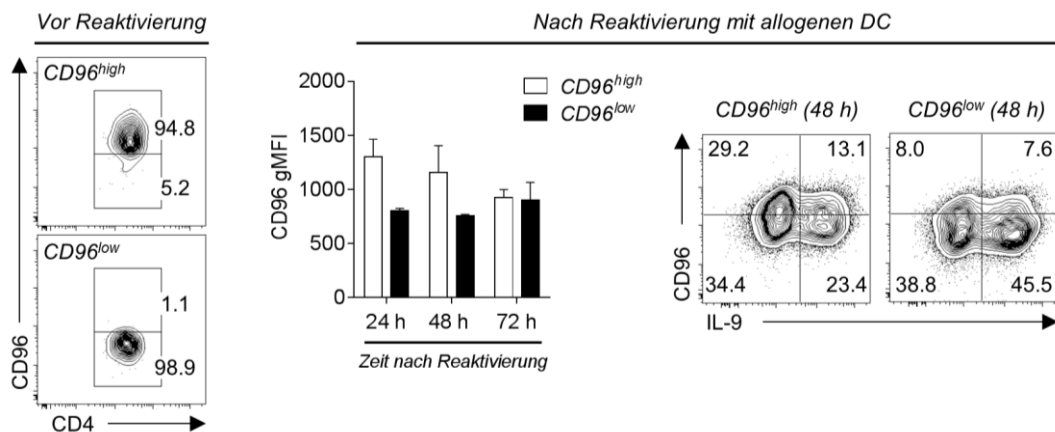


Abb. 3-15. Der Phänotyp von re-aktivierten $CD96^{\text{high}}$ und $CD96^{\text{low}}$ ist über mehrere Tage stabil. $CD96^{\text{high}}$ und $CD96^{\text{low}}$ Zellen wurden aus *in vitro* differenzierten allo-reaktiven C57BL/6 Th9 Ko-Kulturen sortiert und nach 24-stündiger Ruhephase für 72 Stunden mit allogen dendritischen Zellen (DC) re-aktiviert. Die Expression von CD96 und die intrazelluläre IL-9-Produktion wurden durchflusszytometrisch bestimmt. Die Punkthistogramme sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche. Das Balkendiagramm zeigt $n = 3$ als MW \pm SEM. gMFI, geometric mean fluorescence intensity; MW, Mittelwert; SEM, standard error of the mean.

3.7 Inflammatorische Eigenschaften von $CD96^{\text{high}}$ und $CD96^{\text{low}}$ Th9-Zellen

Das höhere Potenzial zur Zytokinproduktion in $CD96^{\text{low}}$ Th9-Zellen deutete auf ein größeres inflammatorisches Potenzial hin. Um diese Vermutung zu prüfen, wurden $CD96^{\text{high}}$ und $CD96^{\text{low}}$ Zellen aus *in vitro* differenzierten allo-reaktiven Th9-Kulturen sortiert und getrennt in *Rag1*^{-/-} Mäuse injiziert. Am folgenden Tag erhielten die Tiere ein allogenes Hauttransplantat.

3.7.1 Gewicht, Darmentzündung und Transplantatüberleben

Überraschenderweise schien das inflammatorische Potential der Th9-Zellen auf der Existenz der $CD96^{\text{low}}$ Th9-Zellen zu beruhen, da der charakteristische Th9-induzierte Gewichtsverlust (vgl. Abschnitt 3.3.1) nur in $CD96^{\text{low}}$ -rekonstituierten Tieren zu beobachten war. Diese Tiere verloren innerhalb von 15 Tagen rund 15 % ihres Körpergewichtes, während $CD96^{\text{high}}$ -Empfängertiere ihr Ausgangsgewicht in diesem Zeitraum wieder erreichten und behielten (Abb. 3-16A, Gewicht bei Versuchsende als % von d-1, MW \pm SEM; $CD96^{\text{high}}$: 100,0 \pm 0,7; $CD96^{\text{low}}$: 88,3 \pm 2,4).

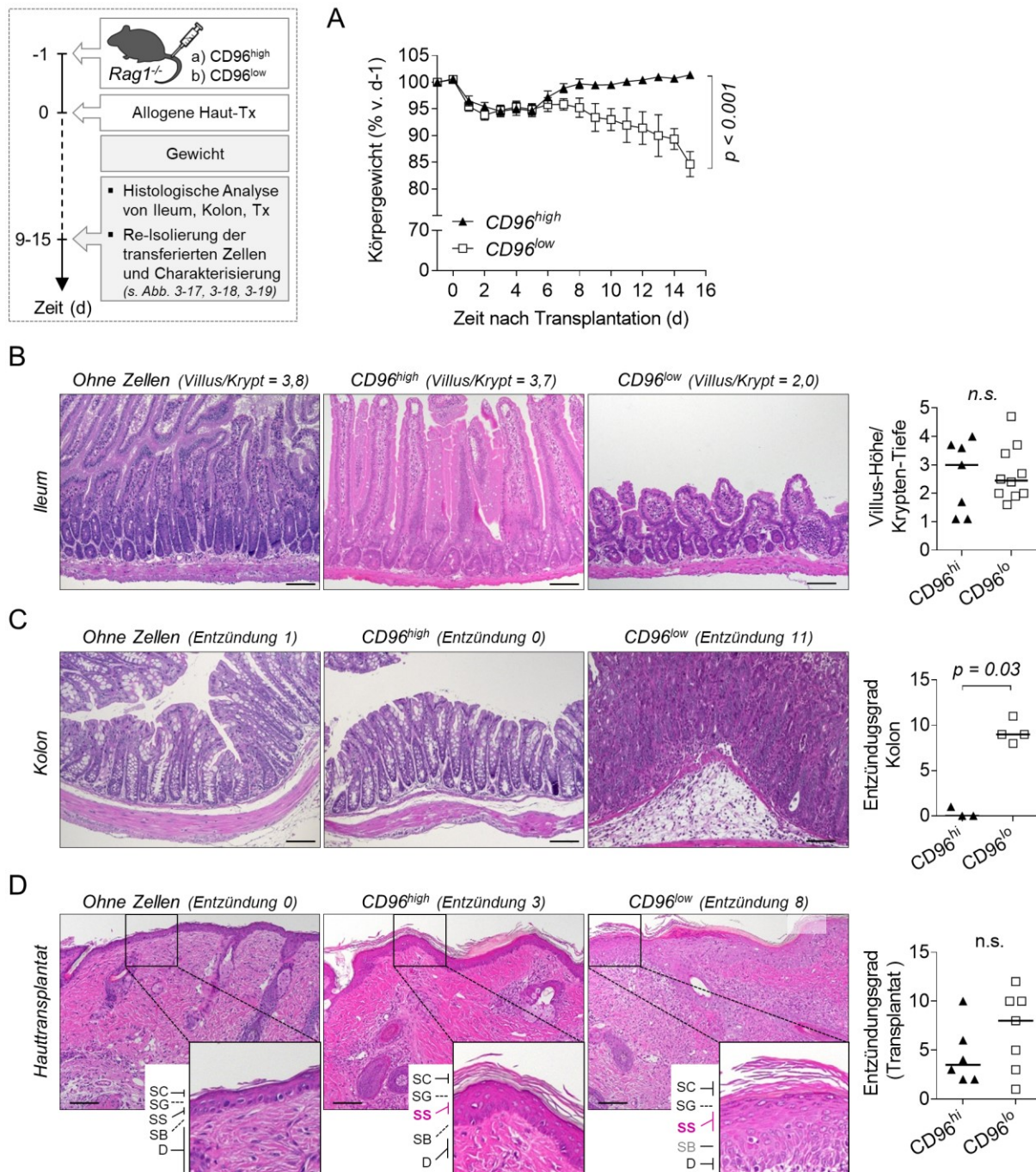


Abb. 3-16. Verglichen mit CD96^{high} Th9-Zellen besitzen CD96^{low} Th9-Zellen ein höheres inflammatorisches Potenzial. Versuchsablauf: C57BL/6 *Rag1*^{-/-} Mäuse wurden mit 1×10^5 CD96^{high} ($n = 3 - 7$) oder CD96^{low} ($n = 4 - 10$) Zellen aus in vitro differenzierten allo-reaktiven C57BL/6 Th9-Kulturen rekonstituiert und erhielten am nächsten Tag ein allogenes Hauttransplantat. (A) Gewichtsverlauf von *Rag1*^{-/-} Empfängertieren als MW \pm SEM. Für die statistische Analyse wurde ein lineares gemischtes Modell an die Gewichtsdaten angepasst. Der p-Wert des Interaktionsterms (Gruppe mit Zeit) wurde dann mittels ANOVA-Typ-III-Test berechnet. (B - D) Hämatoxylin-Eosin gefärbte Schnitte von (B) Ileum gezeigt inkl. Verhältnis von Villus-Höhe zu Krypten-Tiefe (C) Kolon inkl. Entzündungsgrad und (D) Transplantat inkl. Entzündungsgrad. Die Vergrößerung in (D) zeigt die Epidermis bestehend aus dem Stratum (S.) corneum (SC), S. granulosum (SG), S. spinosum (SS), S. basale (SB) sowie einen Teil der Dermis (D). In (B - D) ist der Median eingezeichnet, statistische Auswertung mit einseitigem Mann-Whitney-Test. Maßstab, 100 μ m. Tx, Transplantation; MW, Mittelwert; SEM, standard error of the mean; n.s., nicht signifikant ($p > 0.05$).

Der Gewichtsverlust in CD96^{low}-rekonstituierten Tieren war – genau wie in CD44⁺ Th9-rekonstituierten Tieren – von morphologischen Veränderungen der ilealen Mukosa begleitet. Die Tiere zeigten im Gegensatz zu CD96^{high}-rekonstituierten Tieren verkürzte Villi (**Abb. 3-16B**) und demzufolge ein reduziertes Verhältnis von Villus-Höhe und Krypten-Tiefe, wobei der Unterschied jedoch nicht signifikant war (Verhältnis als \bar{x} [IQS]; CD96^{hi}: **3,0** [1,1 – 3,7]; CD96^{lo}: **2,5** [2,0 – 3,5]). Die Entzündung erstreckte sich auch auf den Dickdarm (Kolon) der CD96^{low}-Empfängertiere und führte dort zu einem deutlich höheren Entzündungsgrad, der aus den Parametern Infiltration, Epithelhypoplasie, Becherzellverlust und Kryptenabszess gebildet wurde (**Abb. 3-16C**; Entzündungsgrad als \bar{x} [IQS]; CD96^{hi}: **0** [0 – 1]; CD96^{lo}: **9** [8,3 – 10,5]).

In diesen Versuchen waren die Transplantate noch nicht vollständig abgestoßen, als der Gewichtsverlust in CD96^{low}-Empfängermäusen das Versuchsende erforderlich machte. Sie wurden daher histologisch untersucht. Es zeigte sich, dass die Epidermis von Transplantaten aus CD96^{high}-rekonstituierten Tieren nahezu unversehrt war und eine intakte Organisation der vier Epidermisschichten *Stratum corneum* (SC), *Stratum granulosum* (SG) *Stratum spinosum* (SS) und *Stratum basale* (SB) besaß (**Abb. 3-16D**). Nur das SS war im Gegensatz zu Transplantaten aus Tieren, die keine Zellen erhalten hatten, leicht verdickt. In CD96^{low}-rekonstituierten Tieren war die Abgrenzung zwischen SS und SB vollständig aufgelöst. Weiterhin zeigte das Gewebe aus diesen Tieren einen leicht erhöhten Entzündungsgrad (**Abb. 3-16D**, Entzündungsgrad als \bar{x} [IQS]; CD96^{hi}: **3,5** [2 – 7]; CD96^{lo}: **8** [3 – 10]).

Aus diesen Daten wurde geschlossen, dass CD96^{low} Th9-Zellen im Vergleich zu CD96^{high} Th9-Zellen ein deutlich höheres inflammatorisches Potenzial besaßen.

3.7.2 Gewebsinfiltration und Expansion

Eine histologische Untersuchung der entnommenen Darmproben zeigte, dass der Transfer von CD96^{low} Th9-Zellen mit einer stärkeren Infiltration von CD3⁺ T-Zellen in die ileale Lamina propria assoziiert war (**Abb. 3-17A**, CD3⁺ Zellen pro 10 HPF als \bar{x} [IQS]; CD96^{hi}: **4,0** [0,0 – 6,0]; CD96^{lo}: **21,0** [16,8 – 36,0]). Aufgrund der Verwendung von T-Zell-defizienten Mäusen konnte es sich bei diesen Zellen nur um die transferierten Th9-Zellen handeln. Noch deutlicher war die unterschiedliche Infiltration durch T-Zellen im Kolon der Versuchstiere zu beobachten (**Abb. 3-17B**, CD3⁺ Zellen pro 10 HPF als \bar{x} ; CD96^{hi}: 25; CD96^{lo}: 231). Neben T-Zellen befanden sich im Kolon von CD96^{low}-rekonstituierten Tieren auch deutlich mehr eosinophile Granulozyten als im Kolon von CD96^{high}-behandelten Tieren (**Abb. 3-17C**, eosinophile Granulozyten pro 10 HPF als \bar{x} ; CD96^{hi}: 2; CD96^{lo}: 70).

Ursächlich für die verminderte Gewebsinfiltration und -inflammation (vgl. Abschnitt 3.7.1) in CD96^{high}-Empfängertieren war nicht der frühzeitige Tod der transferierten Zellen. So konnten aus den lymphoiden Organen von CD96^{high}-Empfängertieren 9 bis 15 Tage nach Transfer in Summe mehr als 1×10^5 Zellen und damit mehr Zellen, als initial appliziert wurden, isoliert werden (**Abb. 3-17C**, absolute T-Zellzahl ($\times 10^5$) als \bar{x} [IQS]; d LK: **0,3** [0,2 – 0,4]; mes LK: **1,3** [0,3 – 1,9]; Milz: **1,1** [0,2 – 2,0]). Es zeigte sich jedoch, dass die Anzahl re-isolierter T-Zellen aus den Organen von CD96^{low}-Tieren deutlich höher war (absolute T-Zellzahl ($\times 10^5$) als \bar{x} [IQS]; d LK: **3,5** [1,7 – 6,0]; mes LK: **6,2** [3,2 – 7,0]; Milz: **8,1** [5,1 – 16]).

Zusammengenommen demonstrierten diese Beobachtungen, dass $CD96^{low}$ Th9-Zellen verglichen mit $CD96^{high}$ Th9-Zellen eine höhere Fähigkeit zur Gewebsinfiltration und Expansion besaßen.

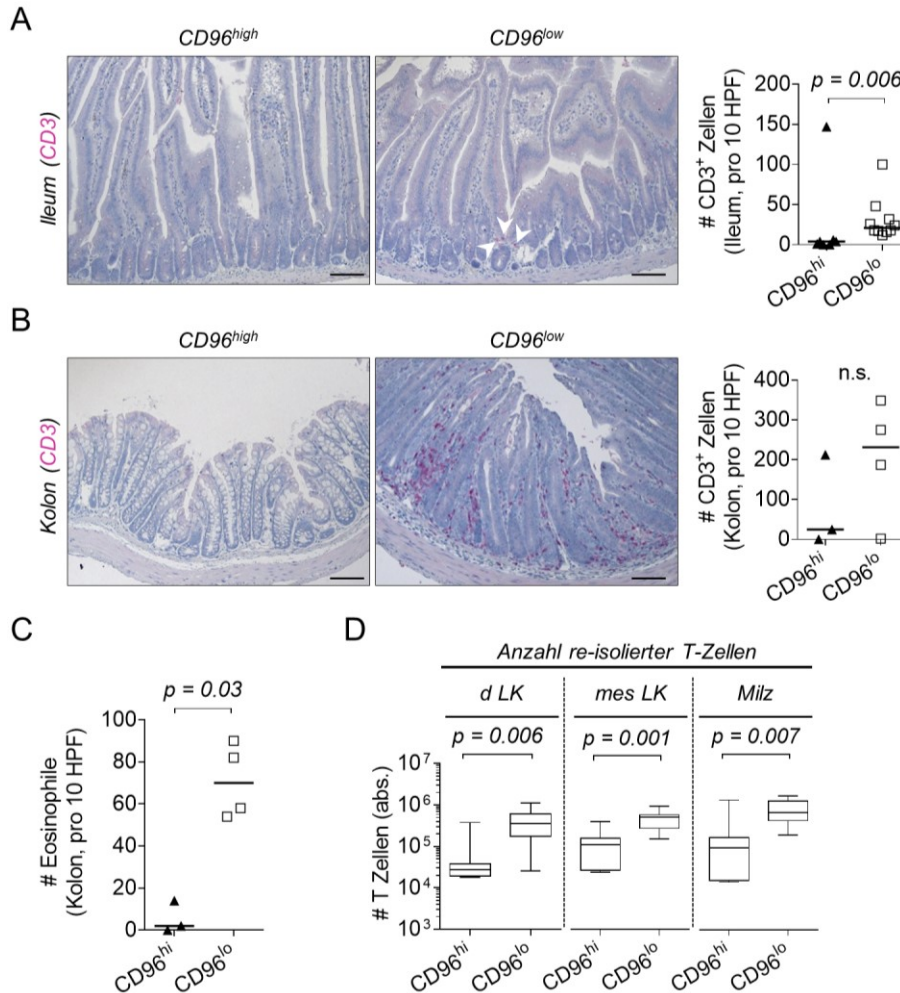


Abb. 3-17. $CD96^{low}$ Th9-Zellen besitzen ein höheres Potenzial zur Infiltration und Expansion. Versuchsablauf s. Abb. 3-16. Anti-CD3-gefärbte Schnitte von (A) Ileum und (B) Kolon inkl. Anzahl CD3⁺ Zellen (Pfeile) pro zehn Hauptgesichtsfelder (*high power field*, HPF) mit Median. Maßstab 100 μ m. (C) Eosinophile Granulozyten pro 10 HPF in gefärbten Kolonschnitten. (D) Absolute (abs.) Zahl an T-Zellen, die aus den drainierenden (d) und mesenterialen (mes) Lymphknoten (LK) sowie der Milz von *Rag1*^{-/-} Mäusen re-isoliert wurden ($CD96^{hi}$: n = 7; $CD96^{lo}$: n = 10). Statistische Auswertung mit einseitigem (A - C) oder zweiseitigem (D) Mann-Whitney-Test. n. s., nicht signifikant ($p > 0.05$).

3.7.3 Zytokinprofil der re-isolierten T-Zellen

Nun wurde untersucht, ob die T-Zellen, die nach Versuchsende aus den lymphoiden Organen re-isoliert wurden (vgl. Abb. 3-17D), weiterhin IL-9 produzierten. Zunächst fiel auf, dass alle re-isolierten T-Zellen stark positiv für CD44 waren (Abb. 3-18A). Die Ursache dafür liegt zum einen im Transfer bereits aktivierter ($CD44^+$) Zellen. Zum anderen wirkt der Mangel an T-Zellen in den $Rag1^{-/-}$ Mäusen stark aktivierend auf die transferierten Zellen. Gemäß dem Prinzip der T-Zellhomöostase expandieren diese Zellen massiv, um das T-Zelldefizit auszugleichen [zusammengefasst in (136)].

In re-isolierten und PMA/Ionomycin-restimulierten T-Zellen aus $CD96^{\text{high}}$ und $CD96^{\text{low}}$ -rekonstituierten Tieren konnte kein IL-9 detektiert werden (Abb. 3-18B). Auch unstimulierte Zellen produzierten kein IL-9 (nicht gezeigt). Stattdessen produzierte ein kleiner Teil der Zellen IL-4 (Abb. 3-18C) und ein deutlich größerer Teil IFN- γ (Abb. 3-18D). Die IFN- γ -Produktion war in T-Zellen aus $CD96^{\text{high}}$ -rekonstituierten Tieren durchschnittlich geringer als in $CD96^{\text{low}}$ -Zellen, wobei dieser Unterschied nicht signifikant war (Abb. 3-18D, IFN- γ^+ T-Zellen als \bar{x} [IQS]; $CD96^{\text{hi}}$ (d LK): **44,9** [19,5 – 65,8], $CD96^{\text{lo}}$ (d LK): **71,1** [60,8 – 78,9], $CD96^{\text{hi}}$ (mes LK): **66,7** [30,7 – 86,2], $CD96^{\text{lo}}$ (mes LK): **79,7** [50,1 – 88,7], $CD96^{\text{hi}}$ (Milz): **38,7** [20,3 – 53,8], $CD96^{\text{lo}}$ (Milz): **58,6** [45,8 – 67,8]). Auch im Transplantat wurde bei Versuchsende kein IL-9 detektiert (nicht gezeigt).

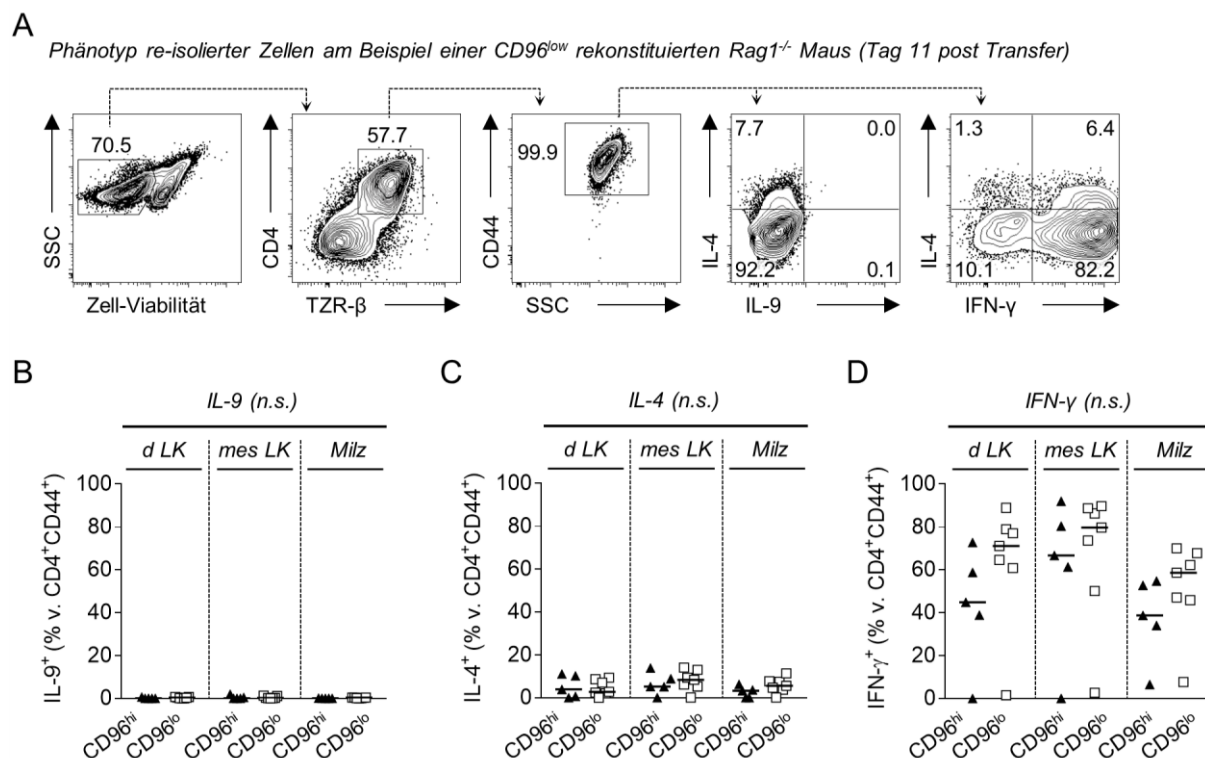


Abb. 3-18. $CD96^{\text{high}}$ und $CD96^{\text{low}}$ Th9-Zellen produzieren nach Transfer in $Rag1^{-/-}$ Mäuse IFN- γ und IL-4 statt IL-9. Versuchsaufbau s. Abb. 3-16. (A – D) Intrazelluläre Zytokinproduktion in T-Zellen nach vierstündiger Restimulation mit PMA und Ionomycin. Die Zellen wurden 9 – 15 Tage nach Transfer in $Rag1^{-/-}$ Mäuse aus den drainierenden (d) und mesenterialen (mes) Lymphknoten (LK) und der Milz re-isoliert. (A) Phänotyp re-isolierter Zellen am Beispiel eines $CD96^{\text{low}}$ -Empfängertieres. (B) IL-9-Produktion (C) IL-4-Produktion und (D) IFN- γ -Produktion in lymphoidem Gewebe aus fünf ($CD96^{\text{hi}}$) bzw. sieben ($CD96^{\text{lo}}$) Tieren. Der Median ist eingezeichnet. Statistische Auswertung mit zweiseitigem Mann-Whitney-Test. SSC, *side scatter* (Seitwärtsstreulicht); TZR- β , β -Kette des T-Zellrezeptors; n. s., nicht signifikant ($p > 0.05$).

3.7.4 CD96-Expression in den re-isolierten T-Zellen

Weiterhin wurde die CD96-Expression vor Transfer mit der Expression auf Zellen, die nach Versuchsende aus den rekonstituierten *Rag1*^{-/-} Mäusen isoliert wurden, verglichen.

Das geometrische Mittel der CD96-Fluoreszenzintensität der transferierten Th9-Zellen betrug 2150 (̄, CD96^{high}) bzw. 292 (̄, CD96^{low}) (Abb. 3-19A). 9 bis 15 Tage nach Transfer in *Rag1*^{-/-} Mäuse zeigten die re-isolierten T-Zellen aus den lymphoiden Organen von CD96^{high}-Empfängertieren nur noch eine geringe CD96-Expression. Diese war mit der Expression in T-Zellen aus CD96^{low}-rekonstituierten Tieren vergleichbar. Dagegen zeigten CD96^{low} Th9-Zellen vor und nach Transfer eine unverändert niedrige CD96-Expression. Auch *in vitro* regulierten allogene re-aktivierte CD96^{high} Th9-Zellen nach 72 h ihre CD96-Expression herunter und hatten sich an das Expressionslevel von CD96^{low} Th9-Zellen angeglichen (vgl. Abschnitt 3.6.3). Demnach steht der Phänotyp der re-isolierten Zellen in Einklang mit dem Phänotyp nach Re-Aktivierung *in vitro*. Weiterhin ist zu erwähnen, dass die zur Detektion von IFN-γ notwendige Restimulation mit PMA und Ionomycin (vgl. Abschnitt 3.7.3) einen negativen Einfluss auf die CD96-Expression ausübte (Abb. 3-19B). Doch auch in unstimulierten T-Zellen aus CD96^{high} Th9-Empfängertieren war die detektierte CD96-Expression nicht höher als in Zellen aus CD96^{low}-rekonstituierten Tieren (Abb. 3-19B, CD96 gMFI als ̄ [IQS]; CD96^{high} – PI: **787** [590,5 – 1128]; CD96^{low} – PI: **987** [823 – 1021]).

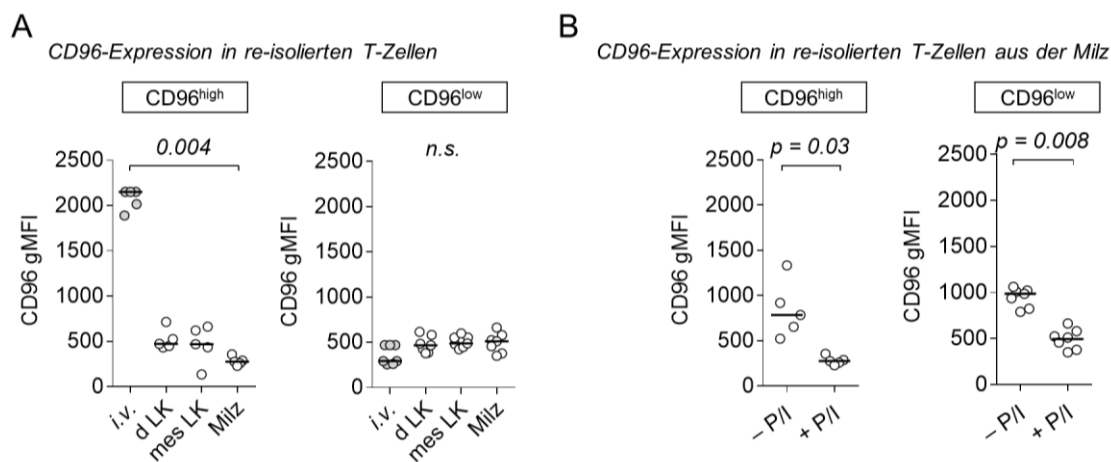


Abb. 3-19. Unabhängig vom Expressionslevel der injizierten Zellen zeigen alle re-isolierten T-Zellen eine niedrige CD96-Expression. Versuchsaufbau s. Abb. 3-16. (A) Geometrisches Mittel der CD96-Fluoreszenzintensität (CD96 gMFI) mit Median in *in vitro* differenzierten C57BL/6 Th9-Zellen vor Transfer (*i. v.*) bzw. 9 – 15 Tage nach Transfer in *Rag1*^{-/-} Mäuse. Die Zellen wurden aus den drainierenden (d) und mesenterialen (mes) Lymphknoten (LK) und der Milz re-isoliert und für 4 Stunden mit PMA und Ionomycin restimuliert. Die statistische Auswertung von n = 5 (CD96^{high}) bzw. n = 7 (CD96^{low}) erfolgte mittels Friedman-Test und ggf. nachfolgendem Dunn-Test. (B) Einfluss der PMA und Ionomycin-Stimulation auf die CD96-Expression gezeigt für re-isolierte T-Zellen aus der Milz von CD96^{high}- bzw. CD96^{low}-Empfängertieren. Die Zellen wurden für 4 Stunden in Ab- (-) oder Anwesenheit (+) von PMA und Ionomycin (P/I) inkubiert. Statistische Auswertung von n = 5 mit einseitigem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. gMFI, *geometric mean fluorescence intensity*; *i. v.*, intravenös; n. s., nicht signifikant (p > 0.05).

3.8 Inflammatorische Eigenschaften in Anwesenheit endogener T-Zellen

Die Versuche mit T-Zell-depletierten *Rag1*^{-/-} Mäusen hatten gezeigt, dass CD96^{low} Th9-Zellen im Vergleich zu CD96^{high} Th9-Zellen deutlich pathogener waren. Ob diese Eigenschaft auch in Gegenwart nicht-Spender-reaktiver T-Zellen zutrifft, sollte mit dem folgenden Versuch überprüft werden.

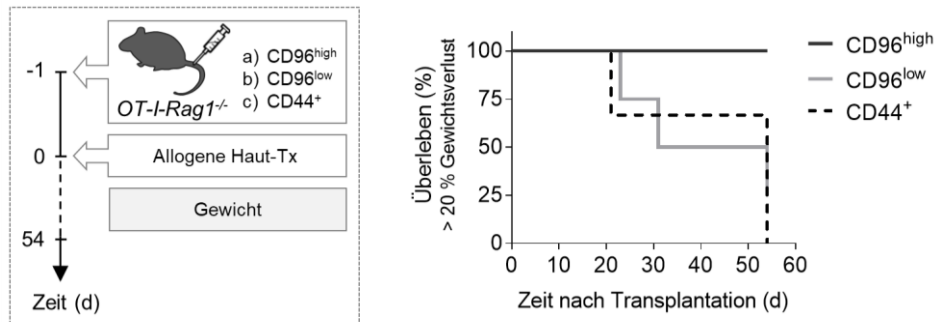


Abb. 3-20. Der Transfer von CD44⁺ und CD96^{low} aber nicht CD96^{high} Th9-Zellen induziert Gewichtsverlust in *OT-I-Rag1*^{-/-} Mäusen. *OT-I-Rag1*^{-/-} Mäuse erhielten 1×10^5 nicht-separierte (CD44⁺, n = 3), CD44⁺CD96^{high} (n = 3) oder CD44⁺CD96^{low} (n = 4) Zellen aus *in vitro* differenzierten allo-reaktiven C57BL/6 Th9 Kulturen. Am folgenden Tag wurde ihnen Haut von BALB/c Mäusen transplantiert. Der Gewichtsverlauf ist als Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Die Tiere wurden kurz vor Erreichen eines 20 %-igen Gewichtsverlustes getötet. Log-Rank-Test: nicht signifikant ($p > 0.05$). Die Abstoßungszeitpunkte sind in Tab. 3-4 aufgelistet. Tx, Transplantation

Dazu wurden nicht-separierte (CD44⁺), CD96^{high} und CD96^{low} Zellen aus *in vitro* differenzierten Th9-Kulturen sortiert und in *OT-I-Rag1*^{-/-} Mäuse gespritzt. Anschließend erhielten die Tiere ein allogenes Hauttransplantat. *OT-I-Rag1*^{-/-} Mäuse besitzen im Gegensatz zu *Rag1*^{-/-} Mäusen endogene CD8⁺ T-Zellen, die jedoch aufgrund ihres Ovalbumin-spezifischen transgenen T-Zell-Rezeptors nicht mit der Transplantatabstoßung interferieren können.

Ein akuter Gewichtsverlust wie nach Transfer in *Rag1*^{-/-} Mäuse (vgl. Abb. 3-5C und Abb. 3-16A) wurde in *OT-I-Rag1*^{-/-} Mäusen nicht beobachtet. Langfristig zeigten sich jedoch ähnliche Ergebnisse. Während der Transfer nicht-separierter (CD44⁺) und CD96^{low} Th9-Zellen innerhalb von 20 bis 54 Tagen einen 20 %-igen Gewichtsverlust in den Empfängertieren verursachte, verlor keines der CD96^{high}-rekonstituierten Tiere so viel Gewicht, dass es getötet werden musste (Abb. 3-20). Weiterhin stießen CD96^{high}-Empfängertiere ihre allogenen Transplantate leicht verzögert ab (Tab. 3-4). Diese Daten belegten den inflammatorischen Charakter von CD96^{low}, aber auch nicht-separierten (CD44⁺) Th9-Zellen in Abwesenheit endogener T-Zellen.

Tab. 3-4. Überleben allogener BALB/c Haut in *OT-I-Rag1*^{-/-} Mäusen nach Transfer von 1×10^5 Zellen. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Transferierter Zelltyp	Zeitpunkt der Abstoßung (Tage nach Operation)
CD44 ⁺	13, 16, > 27
CD96 ^{high}	16, 16, 21, 27
CD96 ^{low}	13, 16, 16

3.9 Effekt der Antikörper-vermittelten Blockade von CD96

Es stellte sich nun die Frage, ob die differenzielle Expression von CD96 nur als Unterscheidungsmerkmal zwischen inflammatorischen- und nicht-inflammatorischen Th9-Zellen zu werten war oder ob die Expression auch funktionelle Relevanz besaß.

3.9.1 Blockade *in vivo*

Dazu wurden CD96^{high}-rekonstituierte *Rag1*^{-/-} Mäuse mit Tieren verglichen, die CD96^{high} Th9-Zellen in Kombination mit einem CD96-blockierenden Antikörper erhalten hatten. Wenn CD96 tatsächlich die Effektorfunktionen von Th9-Zellen regulieren sollte, so würden die Antikörper-behandelten Tiere ein ähnliches inflammatorisches Profil zeigen wie CD96^{low}-Empfängertiere.

In der Tat verursachte die einmalige Injektion des α -CD96-Antikörpers im Gegensatz zur Injektion eines Isotyp-Kontrollantikörpers (IgG1) einen Gewichtsverlust in den Mäusen (**Abb. 3-21A**; Gewicht bei Versuchsende als % von d-1, MW \pm SEM; α -CD96: $86,8 \pm 2,4$; IgG1: $95,2 \pm 2,9$). Die histologische Untersuchung der Transplantate ergab, dass die Abgrenzung der vier Epidermisschichten *Stratum corneum* (SC), *Stratum granulosum* (SG) *Stratum spinosum* (SS) und *Stratum basale* (SB) in anti-CD96-behandelten Tieren vollständig aufgelöst war (**Abb. 3-21B**). Weiterhin zeigten diese Tiere einen erhöhten Transplantat-Entzündungsgrad (**Abb. 3-21B**, Entzündungsgrad als \bar{x} [IQS]; ohne Ak (-): **3,5** [2,0 – 7,0]; α -CD96: **6,0** [5,3 – 9,8]) und es wanderten tendenziell mehr T-Zellen in das Transplantat ein als bei unbehandelten Vergleichstieren (**Abb. 3-21B**; CD3⁺ Zellen pro 10 HPF als \bar{x} [IQS]; ohne Ak: **19,0** [15,0 – 82,0]; α -CD96: **67,0** [34,5 – 162,5]).

Trotz Gewichtsabnahme verschlechterte sich das Verhältnis von Villus-Höhe zu Krypten-Tiefe durch die Antikörper-Injektion allerdings nicht (**Abb. 3-21C**; Verhältnis als \bar{x} [IQS]; ohne Ak (-): **3,0** [1,1 – 3,7]; α -CD96: **3,6** [1,1 – 4,6]). Jedoch zeigten erste unter Vorbehalt zu bewertende Daten aus dem histologisch untersuchten Kolon der Tiere eine deutlich höhere Infiltration durch CD3⁺ Zellen und eosinophile Granulozyten (**Abb. 3-21D**). Passend dazu wies das Kolon des α -CD96-Tieres den höchsten Entzündungswert auf. Weiterhin stieg auch die Expansionsfähigkeit der CD96^{high} Th9-Zellen durch die CD96-Blockade stark an. Nach Versuchsende wurden aus den lymphoiden Organen der α -CD96-behandelten Tiere vier- bis siebenmal mehr T-Zellen re-isoliert als aus unbehandelten Kontrolltieren (**Abb. 3-21E**).

Grundsätzlich wiesen diese Ergebnisse, trotz z. T. geringer Stichprobengröße, auf eine CD96-vermittelte Regulierung der Th9-Zellantwort im Sinne einer Inhibierung hin.

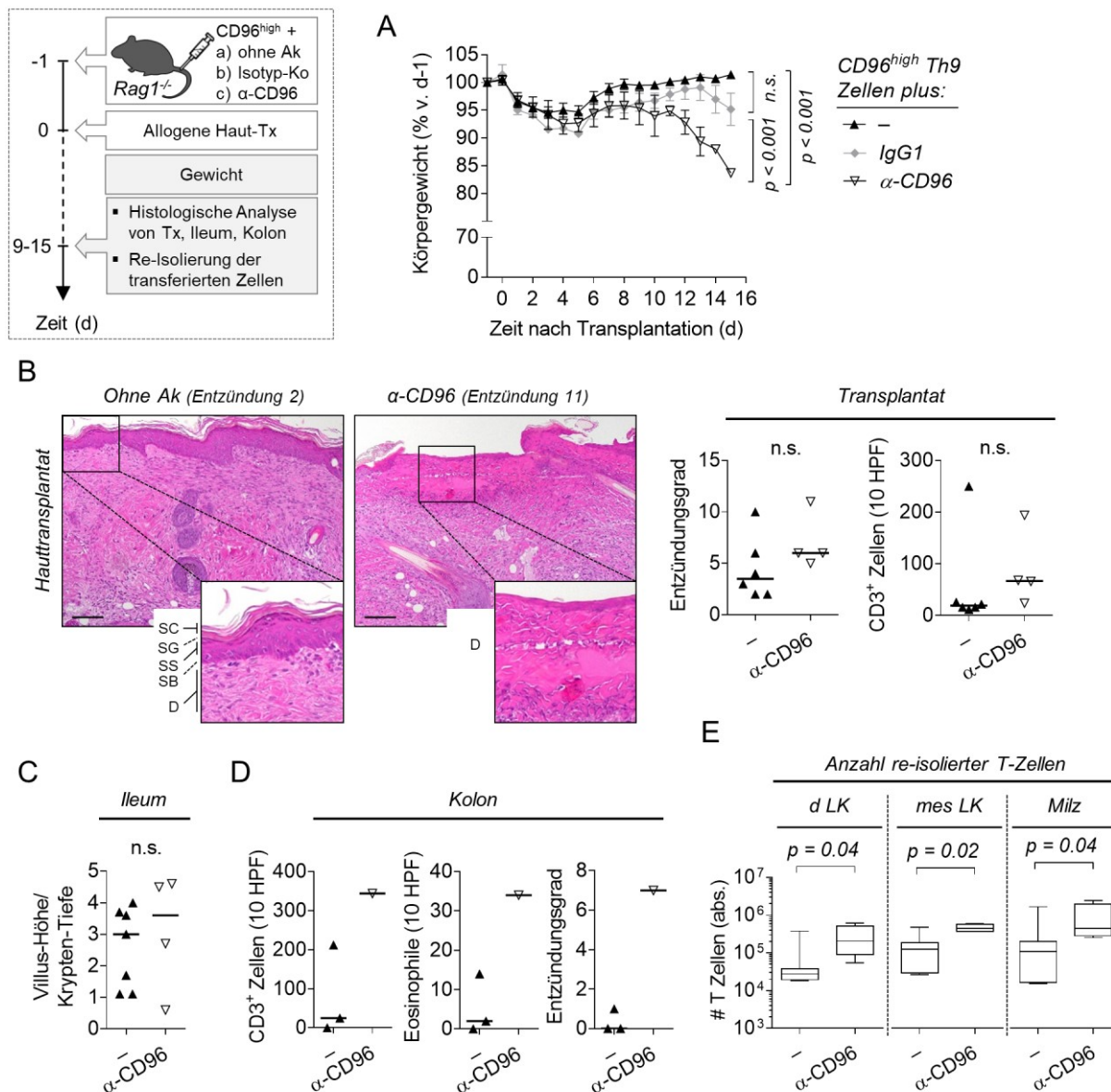


Abb. 3-21. Wiederherstellung der inflammatorischen Effekte von CD96^{high} Th9-Zellen durch CD96-Blockade. Versuchsablauf: C57BL/6 Rag1^{-/-} Mäuse mit 1×10^5 CD96^{high} Zellen aus in vitro differenzierten allo-reaktiven C57BL/6 Th9-Kulturen erhielten intraperitoneal 250 µg eines anti-CD96 Antikörpers (α-CD96, n = 4), eines Isotyp-Kontrollantikörpers (IgG1, n = 3) oder blieben unbehandelt (ohne Ak, n = 6 – 7). Am nächsten Tag erhielten alle Tiere ein BALB/c-Hauttransplantat. Aufgrund eines Fehlers bei der Probenentnahme konnte das Kolon nur aus einem α-CD96-Tier untersucht werden. (A) Gewichtsverlauf von Rag1^{-/-} Empfängertieren als MW ± SEM. Für die statistische Analyse wurde ein lineares gemischtes Modell an die Gewichtsdaten angepasst. Der p-Wert des Interaktionsterms (Gruppe mit Zeit) zwischen zwei Gruppen wurde dann mittels ANOVA-Typ-III-Test berechnet. (B) Repräsentative Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Transplantatschnitte. Die Vergrößerung zeigt die Epidermis bestehend aus Stratum corneum (SC), S. granulosum (SG), S. spinosum (SS), S. basale (SB) sowie einen Teil der Dermis (D) bzw. nur die veränderte Dermis ohne Epidermis (α-CD96-Foto). Zusätzlich ist der zugehörige Entzündungsgrad des Transplantats sowie die Anzahl CD3⁺ Zellen pro zehn Hauptgesichtsfeldern (high power field, HPF) mit Median angegeben. Maßstab 100 µm. (C) Verhältnis von Villus-Höhe zu Krypten-Tiefe in der ilealen Mukosa (D) Anzahl CD3⁺ Zellen und eosinophiler Granulozyten pro 10 HPF in immunhistochemisch gefärbten Kolonschnitten sowie Kolonentzündungsgrad. (E) Absolute (abs.) T-Zellzahl, die bei Versuchsende aus den drainierenden (d) und mesenterialen (mes) Lymphknoten (LK) sowie der Milz von Rag1^{-/-} isoliert wurden. In den Abbildungen ist der Median eingezeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit einseitigem (B) oder zweiseitigem Mann-Whitney-Test. Tx, Transplantation; MW, Mittelwert; SEM, standard error of the mean; n.s., nicht signifikant (p > 0.05).

3.9.2 Blockade *in vitro*

Die inflammatorische Wirkung von Th9-Zellen schien vornehmlich auf ihrer IL-9-Produktion zu beruhen, denn die Neutralisierung des Zytokins verhinderte den akuten Gewichtsverlust in Th9-rekonstituierten *Rag1*^{-/-} Mäusen (vgl. Abb. 3-5E). Weiterhin verloren *Rag1*^{-/-} Mäuse nach Transfer von CD96^{low} Th9-Zellen, die durch eine hohe IL-9-Produktion gekennzeichnet waren, stark an Gewicht, während der Transfer von CD96^{high} Th9-Zellen (geringe IL-9-Produktion) keinen Gewichtsverlust verursachte (vgl. Abb. 3-14A und Abb. 3-16A). Es stellte sich also abschließend die Frage, ob die antikörpervermittelte CD96-Blockade mit der IL-9-Produktion interferierte.

Versuche mit *in vitro* differenzierten allo-reaktiven Th9-Zellen zeigten, dass die Expression von CD96 in Anwesenheit von α -CD96 (Klon 3.3) vollständig blockiert wurde, sodass sie nicht länger mit dem Klon 6A6 nachweisbar war (Abb. 3-22A). Die Frequenz der IL-9-einzelpositiven Zellen blieb durch die Anwesenheit des Antikörpers unbeeinflusst (Daten nicht gezeigt). Allerdings erhöhte sich die Frequenz der IL-4/IL-9-doppelpositiven Zellen signifikant (Abb. 3-22B; % IL-4⁺IL-9⁺ in CD4⁺CD44⁺ Zellen als \bar{x} [IQS]: α -CD96: 3,2 [3,1 – 4,2]; IgG1: 2,6 [2,1 – 4,1]). Um den Einfluss der CD96-Blockade gezielt für CD96-exprimierende Zellen analysieren zu können, wurden allo-reaktive CD96^{high} Th9-Zellen sortiert und in Anwesenheit des blockierenden Antikörpers antigenspezifisch re-aktiviert. Hierbei zeichnete sich in ersten unter Vorbehalt zu beurteilenden Versuchen eine erhöhte *Il9*-mRNA-Expression und damit ein erhöhtes IL-9-Expressionspotenzial in α -CD96-behandelten Zellen gegenüber Isotyp-Kontrollantikörper-behandelten Zellen ab (Abb. 3-22C).

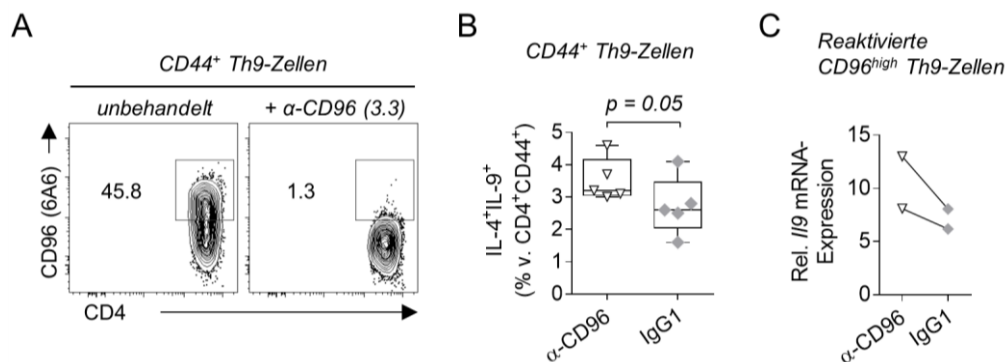


Abb. 3-22. Antikörpervermittelte CD96-Blockade verursacht erhöhte Zytokinproduktion in Th9-Zellen. (A) CD96-Expression (gefärbt mit dem Klon 6A6) und (B) Frequenz von IL-4⁺IL-9⁺ Zellen in *in vitro* differenzierten allo-reaktiven C57BL/6 Th9-Zellen (mit Median). 24 Stunden nach Beginn der Kultivierung wurden die Kulturen mit 5 μ g/ml anti-CD96 Antikörper (α -CD96, Klon 3.3, n = 5) bzw. Isotyp-Kontrollantikörper (IgG1, n = 5) behandelt und für weitere 48 Stunden kultiviert. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem einseitigen Mann-Whitney-Test. (C) *Il9*-mRNA-Expression (relativ zur Expression des Referenzgenes *Hprt*) in re-aktivierten CD96^{high} Th9-Zellen. Die Zellen wurden aus *in vitro* differenzierten allo-reaktiven C57BL/6 Th9-Zellen sortiert und für 48 Stunden in Gegenwart von 50 μ g/ml α -CD96 bzw. IgG1 für 48 Stunden durch allogene DC re-aktiviert. DC, dendritische Zelle; *Hprt*, Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase.

4. Diskussion

Th9-Zellen werden gegenwärtig als eigenständige Th-Subgruppe betrachtet und zählen zu den potentesten IL-9-Produzenten des Körpers. In zahlreichen Studien wurde ihr inflammatorischer Charakter im Rahmen erwünschter (z. B. Parasitenabwehr) und unerwünschter (z. B. Colitis ulcerosa) Immunreaktionen bewiesen. Gleichzeitig existieren aber auch Berichte über anti-inflammatorische Funktionen von Th9-Zellen. Insbesondere bei der Immunantwort nach allogener Transplantation überwiegen Hinweise auf eine Toleranz-erzeugende Wirkung von Th9-Zellen. Dieser Widerspruch über das inflammatorische Potenzial der Th9-Zellen deutete auf eine funktionelle Heterogenität hin, die in der vorliegenden Arbeit erstmals untersucht wurde.

In ihrer Gesamtheit zeigten Th9-Zellen unzweifelhaft einen inflammatorischen Charakter. So verursachte der Transfer von *in vitro* differenzierten Th9-Zellen in immundefiziente *Rag*^{-/-} Mäuse die Abstoßung eines allogenen Hauttransplantates, einen akut einsetzenden Gewichtsverlust sowie eine Entzündung des Darms. Eine Genexpressionsanalyse auf Einzelzell-Ebene ergab jedoch die Aufspaltung der Th9-Zellen in zwei Fraktionen, die sich in weiteren Experimenten als Subpopulationen mit gegensätzlicher pathogener Potenz herausstellten. Während der Transfer von CD96^{low} Th9-Zellen in *Rag*^{-/-} Mäuse einen akuten Gewichtsverlust mit intestinaler Entzündung und eine Transplantatabstoßung induzierte, zeigten CD96^{high}-Empfängertiere kaum Anzeichen einer Darmentzündung und verloren dementsprechend kein Gewicht. Beide Subpopulationen wiesen einen vergleichbaren Th9-Differenzierungsgrad auf. Allerdings besaßen CD96^{low} Th9-Zellen ein wesentlich höheres Potenzial zur Zytokinproduktion und expandierten stärker. Die Expression von CD96 war dabei auch funktionell relevant, denn die Blockade des Rezeptors stellte die inflammatorischen Eigenschaften von CD96^{high} Th9-Zellen wieder her. Berichte über die gegensätzlichen Th9-vermittelten Effekte *in vivo* könnten daher mit der Dominanz einer der beiden Th9-Subpopulation begründet werden. Ferner eröffnet die Modulation von CD96^{low} Th9-Zellen möglicherweise eine neue Therapieoption für Patienten mit Colitis ulcerosa.

4.1 *In vitro* Differenzierung von antigenspezifischen Th9-Zellen

4.1.1 Die MLC als physiologisches Modell zur Untersuchung von Th-Zellfunktionen

Aufgrund der hohen Variabilität des TZR werden T-Zellen *in vitro* meist unter Umgehung ihrer TZR-Spezifität aktiviert. Dieser Aktivierungsmodus ist jedoch mit einigen Kompromissen verbunden. In gängigen Protokollen wird die Aktivierung häufig durch Mitose-induzierenden Substanzen (sog. Mitogene) wie z. B. Phythämagglutinin und Concanavalin A oder durch anti-CD3/CD28-Antikörper induziert. Insbesondere letztgenannte repräsentieren den Goldstandard bei der Charakterisierung von Th-Zellfunktionen (137). Die Stimulation von CD3 ersetzt dabei Signale, die unter physiologischen Bedingungen durch die Bindung des spezifischen Antigens an den TZR ausgelöst werden, während die Bindung des anti-CD28-Antikörpers das ko-stimulatorische Signal einer APZ mimt. In der Konsequenz wird ein Großteil der T-Zellen unabhängig von ihrer Spezifität (d. h. polyklonal) aktiviert. Obwohl die Stimulation mit anti-CD3/CD28 vermutlich physiologisch relevanter ist als die Mitogen-induzierte T-Zellaktivierung (138), kann auch sie die komplexe Interaktion zwischen APZ und T-Zelle nicht abbilden. Entsprechend berichteten Tan *et al.* und Shi *et al.* über die unterschiedliche Pathogenität von polyklonal und APZ-aktivierten Th1-, Th17- und Th9-Zellen (137, 139). Die Ursache dieser funktionellen Diskrepanz ist unter anderem im unterschiedlichen Ausmaß der Zytokinproduktion zu vermuten. So ist z. B. für Th9-Zellen bekannt, dass die Stimulation von OX40 durch OX40-Ligand auf den APZ die IL-9-Produktion unter Th9-polarisierenden Bedingungen maßgeblich erhöht (140). Darüber hinaus wirkte sich auch die Ko-Stimulation von 41BB durch 41BB-Ligand auf den APZ förderlich auf die IL-9-Expression aus (141). Diese Beobachtungen zeigen, dass die Wahl des *in-vitro*-Stimulationssystems ausschlaggebend für die Übertragbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse auf die Situation im Organismus ist.

In den oben zitierten Studien von Tan *et al.* und Shi *et al.* wurde die APZ-vermittelte Aktivierung durch den Einsatz transgener T-Zellen mit definierter Peptidspezifität realisiert. Es ist jedoch bekannt, dass auch das Antigen selbst modulierend auf die Aktivierung und insbesondere auf die Differenzierung der T-Zelle wirkt. Beispielsweise begünstigen Antigene, die mit einer hohen Affinität gebunden werden, die Ausbildung einer Th1-Antwort, während Tfh-Zellen auch nach Kontakt mit schwach- und mittel-affinen Liganden entstehen (142). Entsprechend liegt die Vermutung nahe, dass auch transgene Th-Zellen nicht die Komplexität der unter physiologischen Bedingungen aktivierten Th-Zellen widerspiegeln können.

Im Unterschied zu den bisher vorgestellten Modellen verläuft die T-Zellaktivierung bei der gemischten Leukozytenkultur (MLC) weitestgehend physiologisch. Hier erkennen gentechnisch *unveränderte* T-Zellen vielfältige Antigene im MHC-Klasse-II-Kontext und erhalten zudem ko-stimulatorische Signale von der APZ. Im Gegensatz zu polyklonal stimulierten bzw. TZR-transgenen T-Zellen wird zudem – genau wie *in vivo* – nur ein Bruchteil der Zellen aktiviert. Aus diesem Grund ist die MLC in der hier verwendeten Form nicht nur als Modell zur Untersuchung allogener T-Zellantworten, sondern auch als physiologisch relevantes System der primären T-Zellaktivierung zu betrachten. Weiterhin ist die ausgeprägte IL-9-Produktion (> 60 % der aktivierten T-Zellen, s. Abschnitt 3.1.2) auch als Hinweis auf das hohe Th9-

Differenzierungspotenzial allogen-aktivierter T-Zellen zu verstehen und unterstreicht damit die Vorzüge der MLC als System zur Untersuchung von Th9-Zellen.

4.1.2 LPS-stimulierte DC schaffen ein Th9-begünstigendes Zytokinmilieu

Gleich zu Beginn dieser Arbeit wurde der Einfluss der APZ auf die Th9-Differenzierung deutlich. Es zeigte sich, dass die IL-9-Produktion in Ko-Kulturen mit LPS-stimulierten DC deutlich höher war als in Kulturen mit TNF- α stimulierten DC. Diese Beobachtung ist vermutlich auf die unterschiedliche Zytokinproduktion der DC zurückzuführen.

In diesem Kontext ist zu erwähnen, dass die IL-9-Produktion in Th9-Zellen signifikant durch akzessorische Zytokine wie IL-1 α/β , IFN- α/β , IL-25 und IL-33 begünstigt wird (67, 143-145), da sie die NF- κ B- und NFAT-Signaltransduktion verstärken [zusammengefasst in (79)]. Das erhöhte IL-1 α -Level in LPS-stimulierten DC steht also prinzipiell in Einklang mit der verstärkten IL-9-Produktion. Ob IL-1 α auch tatsächlich ursächlich für die hohe IL-9-Produktion war, muss in zukünftigen Versuchen überprüft werden, in denen das Zytokin z.B. neutralisiert wird. Zusätzliche Untersuchungen sind ebenfalls notwendig, um den Beitrag der erhöhten IL-6- und IL-10-Produktion in LPS-DC zur verstärkten IL-9-Produktion aufzudecken, denn für beide Zytokine sind sowohl begünstigende als auch hemmende Effekte belegt [zusammengefasst in (79)]. Die höhere IL-9-Produktion könnte weiterhin auf IL-1 β und den T-Zellwachstumsfaktor IL-2 zurückzuführen sein, da LPS die Produktion beider Zytokine in einer Studie von Dearman *et al.* förderte (146).

Die Zytokinproduktion in DC wird maßgeblich durch die Aktivierung spezifischer *toll-like* Rezeptoren (TLR) gesteuert. Entsprechend entscheiden die zur Aktivierung eingesetzten Liganden über die freigesetzten Zytokine und damit über ihr Potenzial, die Differenzierung von Th-Zellen zu regulieren. Interessanterweise ist die Aktivierung von TLR4 durch LPS aufgrund der induzierten Expression von IL-12p70 mit der Ausbildung einer IFN- γ^+ Th1-Antwort verbunden [zusammengefasst in (147)]. Diese Daten stehen einerseits im Widerspruch zu der Beobachtung, dass LPS-DC unter Th1-polarisierenden Bedingungen weniger IFN- γ^+ T-Zellen hervorbringen als IL-9 $^+$ Zellen unter Th9-Bedingungen (vgl. Abschnitt 3.1.2.). Andererseits wurde in Th9-Kulturen eine kleine (< 4 %, Daten nicht gezeigt) IFN- γ^+ IL-9 neg Zellpopulation beobachtet. Da bekannt ist, dass IFN- γ die Th9-Differenzierung limitiert (60, 143, 148), wäre es zukünftig von Interesse, den Einfluss verschiedener TLR-Liganden auf die Th9-Differenzierung zu untersuchen. Möglicherweise lässt sich die IL-9-Produktion durch den Einsatz TLR2-stimulierter DC noch steigern, da diese die Ausbildung einer Th2-Antwort begünstigen (149, 150).

4.2 Die inflammatorischen Eigenschaften von allo-reaktiven Th9-Zellen

4.2.1 Die kolitogene Potenz von Th9-Zellen im Vergleich zu Th1-Zellen

Es ist schon lange bekannt, dass der adoptive Transfer von T-Zellen aus gesunden Mäusen in syngene lymphopene Empfängermause eine Kolitis induzieren kann (T-Zell-Transfer-Modell der experimentellen Kolitis). Dabei sind die Eigenschaften der transferierten Zellpopulationen ausschlaggebend. Während der Transfer von naiven ($CD45RB^{high}$) T-Zellen innerhalb von fünf bis zehn Wochen eine intestinale Entzündung mit Diarrhoe und Gewichtsverlust in den Empfängertieren herbeiführt, entwickeln Empfänger von Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen ($CD45RB^{low}$) keine Kolitis [(128) und zusammengefasst in (151)]. Diese Beobachtung begründet sich in der Tatsache, dass die naive Zellfraktion keine $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen enthält (152). Diese sind jedoch notwendig, um spontan differenzierende kolitogene (d. h. Kolitis-auslösende) Th1- und Th17-Zellen zu supprimieren (153-155). Entsprechend finden sich in der Lamina propria von Mäusen mit experimenteller Kolitis hohe Frequenzen an $IFN-\gamma^+$ T-Zellen. IL-17-produzierenden Th17-Zellen konnten in der Lamina propria nur in geringer Frequenz nachgewiesen werden (156, 157). Ihnen kommt jedoch eine essenzielle Bedeutung bei der Initiierung der Entzündung zu, denn naive T-Zellen aus Mäusen mit einer Defizienz für den Th17-Master-Regulator ROR γ t konnten keine Kolitis im Zelltransfermodell auslösen (154). Später zeigte sich, dass Th17-Zellen ein hohes Maß an Plastizität besitzen und von der IL-17-zur $IFN-\gamma$ -Produktion wechseln können (158, 159). Dementsprechend ist die experimentelle Transferkolitis in erster Linie als Th1-vermittelter Prozess zu betrachten, auch wenn die $IFN-\gamma$ -produzierenden T-Zellen atypischer Herkunft sein können.

Basierend auf diesen publizierten Daten hätte angenommen werden können, dass der Transfer von differenzierten $IFN-\gamma^+$ Th1-Zellen, die aus naiven $CD25^{neg}CD4^+$ T-Zellen generiert wurden und daher keine Treg-Zellen enthielten, die Kolitisentstehung in *Rag*^{-/-} Mäusen maßgeblich beschleunigte. Tatsächlich verloren jedoch nicht Th1-, sondern Th9-rekonstituierte *Rag*^{-/-} Mäusen akut an Gewicht. Diese Beobachtung impliziert, dass der IL-9-vermittelten Störung der intestinalen Barriere (106, 110) eine größere Bedeutung zukommt als der Kolitis-auslösenden Wirkung von $IFN-\gamma$. Auch histologisch ähnelte der Darm von Th1-Empfängertiere noch stark dem Gewebe nicht-rekonstituierter Kontrolltiere, während in Th9-Empfängertieren deutliche morphologische Veränderungen zu beobachten waren. Hier waren insbesondere die verkürzten Mikrovilli nach Transfer von Th9-Zellen in Einklang mit der hemmenden Wirkung von IL-9 auf die Proliferation intestinaler Epithelzellen zu bringen (106). Wahrscheinlich wäre bei einer Verlängerung des Beobachtungszeitraumes auch in Th1-rekonstituierten Tieren eine intestinale Entzündung zu erwarten gewesen. Diese Annahme wird gestützt durch die Tatsache, dass die Villi in Th1-Empfängertieren verglichen mit denen nicht-rekonstituierter Kontrolltiere bereits leicht verbreitert waren. Weiterhin hatte ein exemplarisch für längere Zeit beobachtetes Versuchstier 38 Tage nach Transfer von Th1-Zellen mehr als 8 % seines Ausgangsgewichtes verloren, wobei der Kot bereits eine weiche Konsistenz aufwies (Daten nicht gezeigt). Der Zeitpunkt der Th1-vermittelten Gewichtsabnahme deckte sich mit Daten aus einer Studie, in der nach Transfer von

antigenspezifischen Th1-Zellen in *Rag*^{-/-} Mäuse ebenfalls nach 42 Tagen ein signifikanter Gewichtsverlust beobachtet wurde (160). Das auffällig hohe kolitogene Potenzial von Th9-Zellen war jedoch kein Ausdruck einer generell erhöhten inflammatorischen Potenz, denn die Abstoßung allogener Hauttransplantate erfolgte in Th1- und Th9-rekonstituierten Tieren mit ähnlicher Geschwindigkeit.

Ob die Kolitisentstehung von der TZR-spezifischen Restimulation mit dem Alloantigen in Form des Hauttransplantats abhängig ist, wurde nicht untersucht. Versuche mit Ovalbuminspezifischen Th1- und Th2-Zellen, die nur nach antigenspezifischer Restimulation eine Kolitis in *Rag2*^{-/-} Mäusen induzierten (160), lassen vermuten, dass die allogene Restimulation für die Kolitisinduktion erforderlich ist.

Dass der akute Gewichtsverlust in Th9-rekonstituierten Mäusen durch die Neutralisation von IL-9 aufgehalten werden zeigte nicht nur, dass dieser Effekt IL-9-vermittelt war, sondern auch, dass die Darmentzündung nicht auf die mit-transferierten IL-9^{neg} Zellen zurückzuführen war. Diese Zellen machten auf Proteinebene rund 40 % der Zellen aus. Interessanterweise wurde in der Einzelzell-Genexpressionsanalyse deutlich, dass auch diese Zellen *Il9* transkribierten und damit theoretisch das Potenzial zur Proteinsekretion besaßen. Diese Beobachtung spricht stark für die Existenz post-transkriptioneller Regulationsmechanismen wie es z. B. auch schon für die Expression von IFN- γ in allo-reaktiven T-Zellen nach Gabe eines nicht-depletierenden anti-CD4-Antikörpers beschrieben wurde (161). Die inhibierte IFN- γ -Proteinsynthese wurde in dieser Studie mit einer verminderten Aktivierung des Translationsinitiationsfaktors eIF2 α in Verbindung gebracht. Ein weiterer post-transkriptioneller Regulationsmechanismus, der bereits vielfach für Zytokine, Chemokine und pro-inflammatorische Proteine beschrieben wurde, ist die Kontrolle der mRNA-Stabilität über Adenin- und Uridin-reiche Elemente (ARE) [zusammengefasst in (162)]. Diese Sequenzmotive befinden sich in der 3' untranslatierten Region (3' UTR) der mRNA und dienen als Bindestellen für Proteine, die den Abbau der mRNA auslösen können. Eine Analyse der murinen *Il9*-Sequenz ergab drei hintereinandergeschaltete ARE in Form von AUUUA-Pentameren (ATTTA in der DNA-Sequenz; s. Anhang Abschnitt 7.2), die möglicherweise ursächlich für die fehlende IL-9-Proteinsynthese in IL-9^{neg} Zellen sein könnten. Weiterhin ist auch bekannt, dass die Expression von IL-9 in Th-Zellen durch microRNA (kleine nicht-kodierende RNA-Sequenzen) supprimiert werden kann (163). Welcher dieser Mechanismen tatsächlich ausschlaggebend für die reduzierte IL-9-Expression in IL-9^{neg} Zellen ist, wird in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden müssen.

4.2.2 Hohes kolitogenes Potenzial trotz geringem Aktivierungsgrad?

Eine Analyse von zelloberflächlich exprimierten Molekülen ließ in Th9-Zellen einen distinkten Phänotyp nach Aktivierung erkennen, der sich deutlich von unpolarisierten (Th0) und Th1-polarisierten Zellen abhob. Dass die beiden Vergleichsgruppen hinsichtlich ihres Oberflächenexpressionsmusters große Übereinstimmung zeigten, war zu erwarten, da die allogene Immunreaktion *per se* mit der Ausbildung einer Th1-Antwort verbunden ist [zusammengefasst in (127)].

Mit Blick auf die hohe entzündungsauslösende Wirkung von Th9-Zellen wäre anzunehmen gewesen, dass sich Th9-Zellen im Vergleich zu unpolarisierten (Th0) und Th1-polarisierten Zellen durch einen höheren Aktivierungsgrad auszeichnen. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese wurde in Th9-Zellen eine verstärkte Expression der aktivierenden Rezeptoren CD79b und *TNF receptor superfamily member 8* (TNFRSF8, CD30) sowie eine geringe Expression des inhibierenden Rezeptors *killer cell lectin like receptor D1* (KLRD1) beobachtet.

Erstaunlicherweise fielen Th9-Zellen jedoch vielmehr durch ein Expressionsmuster auf, das auf einen *geringen* Aktivierungsgrad und damit auf eine *geringe* entzündungsauslösende Wirkung schließen ließ. So war etwa die Expression der stimulierenden Moleküle CD80, CD40-Ligand (CD40L), CD70 und CD26 in Th9-Zellen besonders gering. Das ko-stimulatorische Molekül CD80 kann von DC auf aktivierte T-Zellen transferiert werden, sodass diese selbst als APZ fungieren (164). Die Bindung von CD40L verstärkt dagegen in DC die Zytokinproduktion, induziert in B-Zellen die Ausbildung der Keimzentren und steigert das Überleben verschiedener Zelltypen [zusammengefasst in (165)]. Die Kreuzvernetzung von CD70, dem Liganden des ko-stimulierenden Rezeptors CD27, verursacht in T-Zellen eine verstärkte Proliferation (166) und auch die Expression des Ektoenzym Dipeptidylpeptidase 4 (DPP4, CD26) ist direkt mit einer Verstärkung der T-Zellaktivierung assoziiert (167, 168). Neben der verringerten Expression von Molekülen mit immunaktivierender Funktion zeichneten sich Th9-Zellen außerdem durch eine verstärkte Expression aktivierungshemmender Moleküle aus. Hier sind insbesondere der ko-inhibierende Rezeptor CTLA-4 und der Rezeptor CD83 zu erwähnen. Letztgenannter wird u. a. von aktivierten tTreg-Zellen exprimiert und trägt *in vivo* zur immunsuppressiven Wirkung von CD4⁺ T-Zellen bei (169). Weiterhin wurde in Th9-Zellen verglichen mit Th0/Th1-Zellen eine deutlich verstärkte Expression von *Platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1, CD31) beobachtet. Dieses Molekül besitzt zwei zytoplasmatische ITIM und fungiert in Leukozyten als inhibitorischer Rezeptor (170). Für das ko-stimulierende Molekül CD28 ist zu erwähnen, dass die CD28-Expression negativ mit der Dauer der Aktivierung korreliert, d. h. CD28^{neg} T-Zellen verkörpern antigenerfahrene und ausdifferenzierte Zellen [zusammengefasst in (8)]. Entsprechend ist die *fehlende* Herunterregulierung der CD28-Expression in Th9-Zellen im Kontext eines geringen Aktivierungsgrades zu betrachten. Die Bedeutung der hohen CD25-Expression ist dagegen nicht eindeutig zu bewerten. Einerseits kommt CD25 in Treg-Zellen eine inhibitorische Funktion zu, da auf diese Weise IL-2 aus der Umgebung abgefangen wird und nicht mehr für die T-Zellaktivierung zur Verfügung steht (171). Andererseits regulieren aktivierte T-Zellen die Expression der hochaffinen α -Kette des IL-2-Rezeptors kurz nach Stimulation deutlich herauf. Somit würde eine hohe CD25-Expression auf ein hohes Aktivierungslevel hindeuten.

Der überwiegend geringe Aktivierungsgrad von Th9-Zellen bzw. die verstärkte Expression suppressiver Moleküle erscheinen auf den ersten Blick widersprüchlich zu ihrer kolitogenen Potenz. Tatsächlich müssen die betrachteten Aktivierungsmarker aber nicht zwangsläufig relevant für die Auslösung der Kolitis sein. An dieser Stelle ist erneut das ausgesprochen hohe IL-9-Expressionspotenzial (vgl. Abb. 3-14B) in Verbindung mit der kritischen Rolle von IL-9 bei der Zerstörung der Darmbarriere hervorzuheben.

4.3 Besonderheiten von CD96^{low} und CD96^{high} Th9-Zellen

4.3.1 IL-9 und weitere inflammatorische Mediatoren

In dieser Arbeit zeigte sich, dass die kolitogene Wirkung von CD96^{low} Th9-Zellen deutlich höher war als die von CD96^{high} Th9-Zellen. Aufgrund des negativen Einflusses von IL-9 auf die Dichtigkeit des Darmepithels ist diese Beobachtung zweifelsohne in Verbindung mit der erhöhten IL-9-Produktion zu betrachten. Zudem zeichneten sich CD96^{low} Th9-Zellen durch ein erhöhtes Expressionspotenzial der Th2-assoziierten Zytokine IL-4 und (tendenziell) IL-5 aus.

Interessanterweise ist auch für Th2-Zellen eine Beteiligung an pro-inflammatorischen Prozessen im Gastrointestinaltrakt belegt [zusammengefasst in (172), (173)]. Mäuse, die den Th2-Master-Regulator GATA-3 überexprimierten, bildeten in einem chemisch induzierten Kolitismodell tatsächlich sogar schwerere Symptome aus als T-bet (Th1) oder ROR γ t (Th17)-transgene Tiere (174). Damit übereinstimmend beschleunigte die Gabe von IL-4 im experimentellen T-Zell-Transfermodell die Kolitisentstehung (175). IL-5 ist dagegen aufgrund seiner Bedeutung als Wachstums- und Aktivierungsfaktor von eosinophilen Granulozyten relevant. So ist die Expression von IL-5 sowohl bei Kolitis [zusammengefasst in (176, 177)] als auch bei der allogenen Immunantwort (117, 178) mit einer verstärkten Infiltration eosinophiler Granulozyten assoziiert. Die Infiltration wird zudem indirekt durch IL-9 begünstigt, denn es ist bekannt, dass IL-9 die Expression des IL-5-Rezeptors auf humanen eosinophilen Granulozyten erhöht (179). So betrachtet könnten IL-5- und IL-9-produzierende CD96^{low} Th9-Zellen die Akkumulation von eosinophilen Granulozyten also zweifach fördern, da sie sowohl den Wachstumsfaktor als auch den Rezeptor bereitstellen. Nach Einwanderung in das entzündete Gewebe können die eosinophilen Granulozyten durch Ausschüttung ihrer Granula zur Entzündung und Gewebsschädigung beitragen. Diese enthalten neben toxischen Sauerstoffderivaten verschiedene Proteine mit zytotoxischer Funktion wie z. B. das eosinophile kationische Protein (*eosinophil cationic protein*, ECP) [zusammengefasst in (180)]. Folglich könnte die tendenziell erhöhte Transkription von *Il5* nicht nur eine Erklärung für die hohe Frequenz an eosinophilen Granulozyten im Kolon von CD96^{low}-Empfängertieren liefern, sondern – in Verbindung mit IL-4 – auch für ihre hohe inflammatorische Wirkung bei Kolitis sowie bei der Transplantatabstoßung.

4.3.2 Transkriptionelle Kontrolle der Th9-Subpopulationen

Trotz der verminderten Produktion von IL-9 repräsentierten CD96^{high} Th9-Zellen vollständig differenzierte Th9-Zellen. So waren zwischen CD96^{high} und CD96^{low} Th9-Zellen keine Expressionsunterschiede hinsichtlich der Th9-relevanten Transkriptionsfaktoren *Irf4* und *Batf* zu beobachten. Tatsächlich war die Expression von *Spi1* (kodiert für PU.1) in CD96^{high} Th9-Zellen tendenziell sogar erhöht, was für einen höheren Th9-Differenzierungsgrad sprechen würde. Laut Chang und Kollegen geht die Expression von PU.1 auch mit einer verminderten Expression der Th2-assoziierten Zytokine IL-4, -5, -10 und -13 einher (181). Demnach könnte das verminderte IL-4- und IL-5-Expressionspotenzial in CD96^{high} Th9-Zellen und folglich ihr geringeres inflammatorisches Potenzial auch auf ihre erhöhte *Spi1*-Expression zurückzuführen

sein. Grundsätzlich ist jedoch anzumerken, dass das Expressionslevel von *Spi1* in allen Th9-Zellen – unabhängig von der betrachteten Subpopulation – sehr gering war. Auch gegenüber unpolarisierten Zellen war die Expression im Gegensatz zu anderen Th9-assoziierten Transkriptionsfaktoren kaum erhöht. Dies ist höchstwahrscheinlich dem verhältnismäßig späten Analysezeitpunkt von 72 h nach Aktivierung geschuldet. Studien mit Th2- (181) und Th9-Kulturen (135) haben gezeigt, dass die Expression von *Spi1* nach Aktivierung *in vitro* bereits nach 24 h Stunden drastisch sinkt.

Weiterhin war die Expression von *Tcf7* (kodiert für T-Zell spezifischer Transkriptionsfaktor 1, TCF1) in CD96^{high} Th9-Zellen signifikant höher als in CD96^{low} Th9-Zellen. Es ist bekannt, dass TCF1 eine kritische Bedeutung in der frühen T-Zellentwicklung besitzt, aber auch an der Regulation verschiedener Th-Zell-Differenzierungsprozesse beteiligt ist [zusammengefasst in (182)]. Beispielsweise unterdrückt TCF1 die Expression von Th1- und Th17-Effektorzytokinen und fördert die Th2-Differenzierung, indem es die Expression von GATA-3 induziert (183, 184). Auch die Entwicklung von Tfh-Zellen wird durch die Expression von TCF1 begünstigt (185, 186). Weiterhin ist TCF1 essenziell für die Bildung und Aufrechterhaltung von CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen (187, 188). Inwiefern TCF1 die Differenzierung von Th9-Zellen beeinflusst, ist derzeit nicht bekannt. Daher ist in zukünftigen Experimenten zu untersuchen, ob die signifikant erhöhte *Tcf7*-Expression in CD96^{high} Th9-Zellen an der Ausbildung des veränderten Phänotyps beteiligt ist.

4.3.3 CD96 – ein T-Zell-Erschöpfungsmarker?

Viele klassische T-Zell-Aktivierungsmarker wie CD25 oder CD69 werden bereits innerhalb von 24 Stunden nach Stimulation heraufreguliert, über einige Stunden bis Tage stabil exprimiert und anschließend wieder herunterreguliert (189). Im Gegensatz dazu ist beschrieben, dass CD96 in den ersten 48 – 72 Stunden nach Aktivierung nicht detektierbar ist und erst nach sechs bis neun Tagen maximal exprimiert wird (43, 44). Entsprechend ist die CD96-Expression als spätes Ereignis der T-Zell-Aktivierung zu sehen. Weiterhin ähnelt der zeitliche Verlauf der CD96-Expression damit der Expressionskinetik einiger inhibierender Rezeptoren, die im Kontext der T-Zell-Erschöpfung (*exhaustion*) Erwähnung finden. Dieser Terminus bezeichnet den allmählichen Rückgang von Effektorfunktionen infolge einer langanhaltenden T-Zellaktivierung und ist unter anderem gekennzeichnet durch die verstärkte Expression inhibitorischer Rezeptoren wie PD-1. [zusammengefasst in (190)]. In einer Studie von Bennett *et al.* war die Expression von PD-1 erstmals nach 48 Stunden detektierbar und erreichte, ähnlich wie CD96, erst nach vier bis sieben Tagen ihr Maximum (191). Die verminderten Effektorfunktionen in CD96^{high} Th9-Zellen könnten daher auch ein Ausdruck genereller Erschöpfung sein.

Zunächst muss darauf hingewiesen werden, dass die beobachtete CD96-Expressionskinetik nicht mit der gegenwärtigen Literatur zu vereinbaren ist. Im Gegensatz zu der von Wang *et al.* berichteten maximalen Expression nach sechs bis neun Tagen (43) wurde die maximale CD96-Expression hier bereits nach 48 bzw. 72 Stunden beobachtet. Da in der zitierten Studie ebenfalls eine allogene T-Zell-Stimulation durchgeführt wurde, sind die beobachteten

Unstimmigkeiten entweder auf Expressionsunterschiede zwischen murinen und humanen T-Zellen zurückzuführen oder die Expression von CD96 verläuft oszillierend mit einem zweiten Expressionsmaximum nach mehr als fünf Tagen (hier nicht untersucht). Abgesehen von dem vermutlich asynchronen Expressionsverlauf von CD96 und PD-1 sprechen weitere Argumente gegen CD96 als erschöpfungsassoziiertes Molekül. Beispielsweise waren CD96^{high} Th9-Zellen nach Transfer keinesfalls dysfunktional, denn sie konnten die Abstoßung eines allogenen Transplantates vermitteln (vgl. Tab. 3-4). Auch Th1-Zellen, die sich durch eine besonders hohe CD96-Expression auszeichneten, waren funktional und lösten eine Abstoßung aus (vgl. Abb. 3-5 A und B). Weiterhin spricht die auf Einzelzell-Ebene beobachtete hohe Expression des IL-7-Rezeptors (CD127) in CD96^{high} Th9-Zellen gegen einen Erschöpfungsphänotyp, denn es ist bekannt, dass erschöpften T-Zellen nur *geringe* CD127-Level exprimieren [zusammengefasst in (192)]. Zusammenfassend deutet nur wenig darauf hin, dass die Expression von CD96 erschöpfte T-Zellen markiert. Tatsächlich gleicht die hier beobachtete Expressionskinetik vielmehr der Kinetik des ko-inhibitorischen Moleküls CTLA-4, dessen maximale Oberflächenexpression ebenfalls nach 72 Stunden erreicht war (193).

Ein weiterer interessanter Befund war, dass unpolarisierte (Th0) und Th9-polarisierte Zellen die maximale CD96-Expression zwar etwa gleich schnell erreichten, jedoch mit völlig unterschiedlicher Geschwindigkeit wieder herunterregulierten. So exprimierten Th9-Zellen nach viertägiger Kultivierung kaum noch CD96, während Th0-Zellen auch nach fünf Tagen noch eine sehr hohe CD96-Expression aufwiesen. Hier stellt sich ganz klar die Frage, durch welche Mechanismen die Expression von CD96 in T-Zellen kontrolliert wird. Zwei Studien erwähnen eine veränderte CD96-Expression im Kontext chronischer Virusinfektion und deuten damit eine aktivierungsabhängige Regulation an (51, 194). Es ist weiterhin denkbar, dass das lokale Zytokinmilieu einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Expression von CD96 ausübt. Beispielsweise ist bekannt, dass TGF- β die Expression des inhibitorischen Rezeptors *killer cell lectin-like receptor G1* (KLRG1) auf CD8⁺ T-Zellen herunterregulieren kann (195). Abgesehen von diesen Indizien existieren gegenwärtig keine Informationen über die Regulierung der CD96-Expression. Dieser Aspekt sollte daher unbedingt Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

4.4 *In vivo* Stabilität von Th9-Zellen

Die Untersuchung re-isolierter T-Zellen aus *Rag*^{-/-} Mäusen zeigte, dass die transferierten CD96^{high} und CD96^{low} Th9-Zellen ihr charakteristisches IL-9-Expressionsprofil verloren hatten und stattdessen IFN- γ und IL-4 produzierten. Auch T-Zellen aus Mäusen, die nicht-separierte CD44⁺ Th9-Zellen erhalten hatten, produzierten bei Versuchsende vorwiegend IFN- γ anstelle von IL-9 (Daten nicht gezeigt). Über den Verlust der IL-9-Produktion nach adoptivem Transfer von Th9-Zellen wurde schon in anderen Krankheitsmodellen berichtet (196, 197). Diese Beobachtungen stellen jedoch die Stabilität der Th9-Zellen und damit ihre Klassifizierung als differenzierte und distinkte Subgruppe in Frage. In welchem Rahmen ist eine irreversible Fixierung des Differenzierungsprogrammes in Th-Zellen überhaupt möglich bzw. sinnvoll?

Die langfristige Prägung der Zellidentität (Differenzierung bzw. *lineage commitment*) erfolgt nicht allein durch das Anschalten spezifischer Gene. Es ist von ebenso großer Bedeutung, dass Gene, die alternative Zellschicksale fördern, *abgeschaltet* werden [zusammengefasst in (198)]. Ein weiteres Merkmal differenzierter Zellen ist die Vererbbarkeit der präferenziellen Genexpression aufgrund epigenetischer Modifizierungen. So kann das Zellschicksal auch bei Abwesenheit eines externen Signals aufrechterhalten werden. Ferner wird die Stabilität differenzierter Th-Zellen häufig durch microRNAs kontrolliert bzw. reguliert [zusammengefasst in (199)]. Die genannten Merkmale wurden in dieser Arbeit nicht eigens überprüft, aber es haben schon viele Gruppen gezeigt, dass Th9-Zellen alle Kriterien einer differenzierten Th-Zellgruppe erfüllen. So ist bekannt, dass in Th9-Zellen das Treg-Entwicklungsprogramm durch die STAT6-vermittelte Foxp3-Hemmung supprimiert wird (78), während PU.1 mit GATA3 interagiert und die Th2-Differenzierung limitiert (71, 181). Zudem wurde mehrfach gezeigt, dass die Genaktivität in Th9-Zellen durch Histonmodifizierungen reguliert wird, wobei speziell die *IL9*-Transkription durch die PU.1-induzierte Acetylierung des *IL9*-Lokus verstärkt wird (71, 73, 74). Weiterhin berichteten Singh *et al.*, dass die Expression von IL-9 in Th9- aber auch in anderen Th-Zellen durch die beiden microRNA miR-15b und miR-16 reguliert werden (163). Abgesehen von der fehlenden Identifizierung eines Th9-spezifischen Master-Regulators ist die Bezeichnung von Th9-Zellen als differenzierte und distinkte Subgruppe folglich ebenso berechtigt wie für Th1- oder Th2-Zellen.

Grundsätzlich können Th-Zellen keinen terminalen (d. h. irreversiblen) Differenzierungsstatus erreichen, da die Expression Th-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktoren nicht fixiert ist [zusammengefasst in (198)]. Entsprechend existieren unzählige Berichte über Dedifferenzierung und Reprogrammierung in Th-Zellen. Treg-Zellen können z. B. nach adoptivem Transfer ihre Foxp3-Expression verlieren und pro-inflammatorische Zytokine wie IFN- γ und IL-17 sezernieren (200, 201). Auch Th17-Zellen können – genau wie Th9-Zellen – in der entzündlichen Umgebung einer Kolitis zur IFN- γ -Produktion wechseln (158, 202-204). Darüber hinaus ist bekannt, dass Th-Zellen verschiedene Master-Regulatoren zeitgleich exprimieren können. Beispielhaft sind hier Foxp3⁺Tbet⁺ Treg/Th1-Zellen (205) und Tbet⁺GATA3⁺ Th1/Th2-Hybridzellen (122) zu erwähnen. Insbesondere Th1/Th2-Zellen zeigen auch in Bezug auf ihr Zytokinprofil einen gemischten Phänotyp. Daher liegt die Vermutung

nahe, dass die bisher nicht beschriebenen IL-4⁺IL-9⁺ Zellen in Th9-Kulturen ebenfalls auf Zellen mit einem (Th2/Th9-) Hybridstatus zurückzuführen sind. Auch die von Veldhoen *et al.* beschriebene Möglichkeit, Th9-Zellen durch Reprogrammierung von Th2-Zellen zu generieren, lässt diese Interpretation zu (62). Zusammenfassend belegen die aufgezählten Beispiele nicht nur, dass Plastizität ein weit verbreitetes Phänomen in Th-Zellen ist, sondern auch, dass sich *lineage commitment* und eine transiente Zytokinproduktion nach unserem derzeitigen Verständnis nicht ausschließen. Unter evolutionären Aspekten betrachtet wäre ein irreversibles Differenzierungsprogramm in Th-Zellen tatsächlich auch ein Nachteil, denn im Gegensatz zu sessilen Herz- oder Nierenzellen, migrieren T-Zellen durch den Organismus und sind ständig wechselnden Bedingungen ausgesetzt. Ihr hohes Maß an Plastizität stellt daher einen evolutionären Vorteil dar (198).

Allerdings scheint die IL-9-Produktion in Th9-Zellen verglichen mit der Zytokinproduktion anderer Th-Zellen in der Tat weniger stabil zu sein. Tan *et al.* beobachteten, dass die Expression von IL-9 nach dreitägiger Kultivierung *in vitro* rapide anstieg und schon am folgenden Tag stark sank (196). Dagegen konnte über den gesamten Beobachtungszeitraum von sechs Tagen ein kontinuierlicher Anstieg von IL-4 in Th2-Kulturen bzw. IL-17 in Th17-Kulturen verzeichnet werden. Eigene Versuche bestätigten die charakteristische IL-9-Expressionskinetik von Tan *et al.* (Daten nicht gezeigt) einschließlich der re-induzierten IL-9-Frequenz nach antigenspezifischer Restimulation [(196), vgl. Abb. 2-2)]. An dieser Stelle ist jedoch hervorzuheben, dass adoptiv transferierte Th9-Zellen *in vivo* ganz klar IL-9-abhängige Effektorfunktionen vermitteln. Die Th9-induzierten Symptome in einem allergischen Asthma-Modell konnten beispielsweise durch die Neutralisation von IL-9 abgemildert werden (72, 206). Zudem hob die IL-9-Neutralisation protektive Th9-vermittelte Effekte in Wurminfektions- (89) und Tumormodellen (100, 101) auf. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte die Th9-induzierte Gewichtsabnahme durch die Gabe eines IL-9-neutralisierenden Antikörpers verhindert werden. Ganz offensichtlich stellt die IL-9-Sekretion in Th9-Zellen trotz ihrer transienten Natur einen hochgradig wirksamen Effektormechanismus dar.

4.5 Die klinische Relevanz von CD96

Die gegensätzlichen inflammatorischen Eigenschaften von CD96^{low} und CD96^{high} Th9-Zellen in Verbindung mit der Wiederherstellung der Pathogenität von CD96^{high} Th9-Zellen durch eine CD96-Blockade implizieren, dass CD96 inhibierend auf die Funktion von CD4⁺ T-Zellen wirkt. Diese Aussage wird gestützt durch die erhöhte Zytokinproduktion, die *in vitro* nach Zugabe eines blockierenden anti-CD96-Antikörper beobachtet wurde (vgl. Abschnitt 3.9.2). Auch Eriksson *et al.* brachten die erhöhte Produktion von Effektormolekülen mit einer geringen CD96-Expression in Verbindung, beschränkten sich mit dieser Aussage aber auf die Produktion von Perforin in CD8⁺ T-Zellen (51). Diese Beobachtungen verdeutlichen, dass eine veränderte CD96-Expression das Ausmaß einer Entzündung regulieren kann. Damit wird CD96 auch für die klinische Nutzung interessant.

4.5.1 Bedeutung als Biomarker

Eriksson *et al.* untersuchten die Expression von CD96 im Kontext einer Infektion mit dem humanen Immundefizienz Virus (HIV) und beobachteten eine negative Korrelation zwischen Viruslast und CD96-Expression (51). Die Ursache der hohen Virustiter vermuteten sie in der gesteigerten Immunpathogenese, da CD96^{neg} T-Zellen mehr zytotoxische Effektormoleküle produzierten. Auch wenn dieser Zusammenhang mechanistisch nicht belegt ist, zeichnet sich hier die Bedeutung von CD96 als messbarer Indikator zur Beurteilung der T-Zellfunktion und des Krankheitsverlaufes bei einer HIV-Infektion ab. Entsprechend könnte eine Veränderung der CD96-Expression einen möglichen Behandlungserfolg anzeigen. Auch bei einer Hepatitis-B-Infektion war die Expression von CD96 gegenüber gesunden Probanden verändert (194). Vor diesem Hintergrund wäre zukünftig zu untersuchen, ob die Expression von CD96 – insbesondere in IL-9⁺ Th-Zellen – auch in Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen verändert ist. Gleichzeitig könnte eine potenziell veränderte CD96-Expression die Basis für einen personalisierten Therapieansatz darstellen (s. Abschnitt 4.5.3.).

4.5.2 Bedeutung als *Checkpoint*-Inhibitor für die Krebsimmuntherapie

Die Signalkaskade, die sich an den CD96-Rezeptor anschließt, wurde bisher kaum untersucht. Dennoch gilt CD96 schon jetzt als potenzielles Ziel in der Immuntherapie gegen Krebs. Beispielsweise konnten *Cd96*-defiziente Mäuse das Wachstum von Lungenmetastasen aufgrund der erhöhten IFN- γ -Produktion durch NK-Zellen deutlich besser kontrollieren als wildtypische Mäuse (50). Auch CD96-blockierende Antikörper verstärkten in verschiedenen Tumormodellen IFN- γ -abhängige NK-Zell-Effektorfunktionen und konnten dadurch zu einer verbesserten Tumorkontrolle beitragen (50, 134). Besonders stark ging die Anzahl der Lungenmetastasen allerdings in Mäusen zurück, in denen neben CD96 auch TIGIT, der zweite inhibitorische Rezeptor der CD226/TIGIT/CD96-Achse, blockiert war (134). Diese Beobachtungen betonen einerseits, dass CD96 unbedingt als Teil eines Rezeptorsystems mit *mehreren* potenziellen Angriffspunkten zu betrachten ist. Andererseits zeigen sie, dass der Aktivierungsgrad von NK-Zellen trotz ihres großen Repertoires an inhibitorischen Rezeptoren entscheidend durch die Blockade von CD96 moduliert werden kann. Aus diesem Grund

werden CD96 (und TIGIT) gegenwärtig als vielversprechende Zielmoleküle bei der Entwicklung neuer *Checkpoint*-Inhibitoren gehandelt [zusammengefasst in (31)].

Es ist bekannt, dass der therapeutische Einsatz von *Checkpoint*-Inhibitoren wie Nivolumab (anti-PD1) und Ipilimumab (anti-CTLA-4) häufig von schweren immunbedingten Nebenwirkungen (*immune-related adverse events*, irAE) begleitet ist [zusammengefasst in (207)]. Als Ursache ist hier die physiologische Bedeutung der Rezeptoren als zentraler Limitierungsmechanismus der T-Zellaktivierung zu nennen. Bei irAE handelt es sich um Autoimmunreaktionen, die sich vorwiegend dermatologisch, gastroenterologisch, endokrinologisch und hepatisch manifestieren. Die Blockade von CTLA-4 verursacht hochgradigere irAE als die Hemmung von PD-1 (208, 209). Diese Beobachtung zeichnete sich bereits im Mausmodell ab: Während *Ctla4*^{-/-} Mäuse aufgrund eines autoimmunen lymphoproliferativen Phänotyps nur ein Alter von drei bis vier Wochen erreichten (21, 22), entwickelten *Pdcd1*^{-/-} (kodiert PD-1) Mäuse mildere Autoimmunreaktionen, die nicht unmittelbar zum Tod führten (210, 211). Daher ist als vielversprechend einzuschätzen, dass *Tigit*- und *Cd96*-defiziente Mäuse keine spontanen Autoimmunreaktionen entwickelten (50, 212). Auch Mäuse mit einer kombinierten Defizienz für CD96 und TIGIT zeigten über einen Zeitraum von 22 Monaten keine spontane Störung der Immunhomöostase (213). Allerdings ist zu erwähnen, dass der Verlust von TIGIT in Mäusen die Empfänglichkeit für experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) steigerte (212). Auch wenn daher anzunehmen ist, dass das Risiko einer Autoimmunreaktion bei entsprechender Prädisposition durch eine therapeutische TIGIT-Blockade steigt, deutete doch vieles darauf hin, dass eine Hemmung von CD96 und/oder TIGIT weniger schwere irAE induzieren wird als eine Behandlung mit anti-CTLA-4 und anti-PD-1. Dadurch würde sich auch der Umfang weiterer therapeutischer Maßnahmen wie der Einsatz von Immunsuppressiva oder ergänzenden Hormonen reduzieren.

4.5.3 Bedeutung für die Therapie chronisch entzündlicher Erkrankungen

Im Unterschied zu Tumorerkrankungen besteht das Problem bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie Colitis ulcerosa (UC) und Autoimmunreaktionen jedoch nicht in einer limitierten, sondern einer überschießenden Reaktion des Immunsystems. Folglich könnte es hier von therapeutischem Nutzen sein, das CD96-Signal zu *verstärken*, um die Funktion von T-Zellen und insbesondere von Th9-Zellen zu inhibieren. Aufgrund der Konkurrenz um den gemeinsamen Liganden CD155 besteht die Herausforderung darin, selektiv das CD96-Signal zu verstärken ohne dabei eine Stimulation des aktivierenden Rezeptors CD226 auszulösen.

Die beste Therapiestrategie, liegt hier in der Entwicklung eines agonistisch wirkenden anti-CD96-Antikörpers (Abb. 4-1, Bild ①). Agonistische anti-Rezeptor-Antikörper bewirken im Unterschied zu *antagonistischen* Antikörpern keine Blockade, sondern eine spezifische Dauerstimulation. Gegen den inhibierenden Rezeptor TIGIT existieren bereits agonistische Antikörper, die den Verlauf von Autoimmunerkrankungen in Tiermodellen wirksam abmildern konnten (38, 214). Das therapeutische Potenzial stimulierender Antikörper (insbesondere für die Krebsimmuntherapie) wurde schon vor langer Zeit erkannt. Inzwischen befinden sich mehr als 20 verschiedene Antikörper in der klinischen Entwicklung [zusammengefasst in (215)]. In

der Praxis erweist es sich jedoch als äußerst schwierig, die optimale Kombination aus Rezeptorsättigung, Dosisfrequenz und Behandlungsdauer zu ermitteln, sodass der therapeutische Effekt derzeit noch suboptimal ist. Entsprechend sind agonistische Antikörper momentan (Stand Juni 2018) weder für die klinische Anwendung zugelassen noch sind sie in Phase III-Arzneimittelstudien eingetreten. Dass agonistische Antikörper nicht nur theoretisch, sondern auch praktisch hoch wirksam sein können, zeigt das Beispiel der Autoantikörper gegen den Rezeptor des Thyreoidea-stimulierenden Hormons, die in Patienten mit Morbus Basedow ursächlich für die Hyperfunktion der Schilddrüse sind.

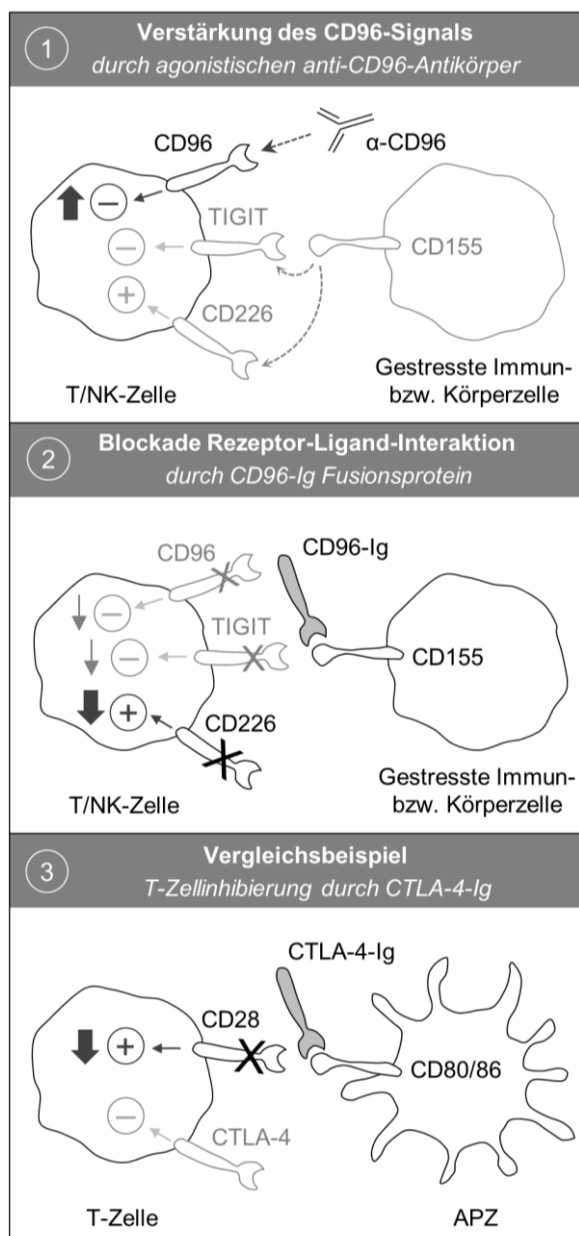


Abb. 4-1. Strategien für die therapeutische Modulation von CD96 bei chronisch entzündlichen Erkrankungen.

Die Abbildung dient der Veranschaulichung der im Text vorgestellten Therapiestrategien. Eine ausführliche Beschreibung ist bitte dem Haupttext zu entnehmen. Hellgrau dargestellte Signalwege spielen für das abgebildete Therapiekonzept eine untergeordnete Rolle. CTLA-4, *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*; Ig, Immunglobulin; APZ, antigenpräsentierende Zelle; NK-Zelle, natürliche Killerzelle; TIGIT, *T cell immunoglobulin and ITIM domain*.

Allerdings ist eine Therapie mit agonistischen Antikörpern nur dann geeignet, wenn der zu stimulierende Rezeptor auch tatsächlich exprimiert wird. Th9-Zellen zeichneten sich jedoch insbesondere im Vergleich zu Th0- und Th1-Zellen durch eine *geringe* CD96-Expression aus. Dieses Expressionsprofil wurde innerhalb unserer Arbeitsgruppe auch für humane CD4⁺ T-Zellen beobachtet [Daten von Franziska Janina Strunk, veröffentlicht in (216)]. Es könnte für die Therapie von UC-Patienten daher sinnvoller sein, die Ligand-Rezeptor-Interaktion durch ein CD96-Ig-Fusionsprotein zu blockieren, um die IL-9-Produktion durch Th9-Zellen zu senken (Abb.

4-1, Bild ②). Dieser Ansatz ist vergleichbar mit der Hemmung der T-Zellaktivierung bei rheumatoider Arthritis oder Organtransplantation durch ein CTLA-4-Ig Fusionsprotein, welches an CD80/86 auf den APZ bindet und so den ko-stimulierenden Rezeptor CD28 aus der Bindung verdrängt (Abb. 4-1, Bild ③). Analog würde CD96-Ig an CD155 binden und die

Ligation mit dem aktivierenden Rezeptor CD226, aber auch mit CD96 und TIGIT verhindern. Die Spezifität würde hier über die Bindungsaffinität erreicht werden, denn von allen drei Rezeptoren bindet CD226 mit der geringsten Affinität an CD155 und würde folglich zuerst aus der Bindung verdrängt werden (vgl. Kapitel 1.4). Dieser global-wirksame Therapieansatz könnte weiterhin durch einen neutralisierenden anti-IL-9-Antikörper ergänzt werden.

4.6 Ausblick

Die hier erhobenen Daten betonen nicht nur die Bedeutung von Th9-Zellen bei der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, sondern eröffnen mit der Entdeckung, dass ihre pathogene Wirkung durch das CD96-Expressionslevel bestimmt wird, auch ein neues Therapiekonzept. Grundsätzlich ist jedoch zu bedenken, dass die Modulation des CD96/CD226/TIGIT-Rezeptorsystems in UC-Patienten nicht nur Th9-Zellen betreffen wird. Hier sind insbesondere CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen hervorzuheben. Entsprechend birgt jeder Versuch, die Balance der Rezeptorsignale zugunsten einer Zellinhibierung zu verschieben, das Risiko, anti-virale und anti-tumorale Aktivitäten abzuschwächen (41, 217-219).

Aufgrund der Tatsache, dass die Expression des gemeinsamen Liganden CD155 im Gegensatz zu CD80/CD86 nicht nur auf Immunzellen beschränkt ist, steht diesem Risiko ein großer therapeutischer Wirkungsbereich gegenüber. Da auch maligne transformierte und viral infizierten Körperzellen infolge eines erhöhten zellulären Stresslevels CD155 exprimieren können [zusammengefasst in (52)], könnte eine Modulation der CD96/CD226/TIGIT-Achse prinzipiell auch Effektorzellen im Gewebe erreichen, die dort durch eine hohe CD155-Expression aktiviert wurden. Dagegen greift die Hemmung der T-Zellaktivierung durch CTLA-4-Ig nur in der frühen Phase der Aktivierung, in der das ko-stimulierende Signal durch CD80/86 benötigt wird. Sobald eine aktivierte T-Zelle in das entzündliche Gewebe migriert ist, agiert sie CD28-unabhängig und ist von der CTLA-4 vermittelten Blockade der Liganden nicht mehr betroffen. In Anbetracht der unterschiedlichen therapeutischen Wirkungsbereiche von CTLA-4-Ig und z. B. CD96-Ig könnte auch eine zeitlich versetzte Therapie mit beiden Biologika sinnvoll sein. Hier wäre ein Konzept denkbar, bei welchem in der ersten Therapiephase zunächst terminal differenzierte Effektor-T-Zellen im Gewebe durch CD96-Ig inhibiert werden. In der zweiten Phase könnte der erneuten T-Zellaktivierung dann mittels CTLA-4-Ig entgegengewirkt werden. Auch ein personalisierter Therapieansatz ist vorstellbar: hier könnten Patienten, die nicht (mehr) auf CTLA-Ig ansprechen, mit CD96-Ig behandelt werden.

Doch bevor eine kurative Modulation der CD96/CD226/TIGIT-Achse z. B. in UC-Patienten in Betracht zu ziehen ist, müssen wir die biologische Signifikanz von CD96 insbesondere in T-Zellen noch besser verstehen. Dazu wird es zunächst notwendig sein, CD96 in Th9-Zellen im Kontext seines regulatorischen Rezeptornetzwerks zu untersuchen. Wie werden CD226 und TIGIT in Th9-, aber auch in anderen Th-Zellen exprimiert? Welche Faktoren kontrollieren die Expression der Rezeptoren und sind verantwortlich für die hohe CD96-Expression in Th0- bzw. Th1-Zellen? Besitzt die CD96-vermittelte Inhibierung eine besondere Relevanz für Th9-Zellen oder würde die Blockade von CD96 auch in Th1-Zellen eine erhöhte Pathogenität

verursachen? Welche Rolle spielen CD96^{high} und CD96^{low} Th9-Zellen bei anderen Darmerkrankungen z. B. bei kolorektalen Karzinomen? Aufgrund der anti-tumoralen Wirkung von Th9-Zellen wäre dieses Modell sogar von besonderem Interesse. Außerdem scheint der Gastrointestinaltrakt aufgrund der Wichtigkeit von TGF- β für die immunologische Balance [zusammengefasst in (220)] und der IL-33-Produktion durch intestinale Epithelzellen die Th9-Differenzierung besonders zu begünstigen. Um die Erkenntnisse von murinen Modellsystemen auf den Menschen übertragen zu können, sollte es außerdem eine hohe Priorität haben, die zytoplasmatischen Signale, die durch die Ligandierung von CD96 ausgelöst werden, aufzuklären. Es könnte nämlich sein, dass die strukturellen Unterschiede, die zwischen dem murinen und dem humanen CD96-Molekül bestehen, funktionelle Unterschiede verursachen. Es ist zum Beispiel verwunderlich, dass murines CD96, jedoch nicht humanes CD96 neben CD155 auch an CD111 binden kann. Auch die Bedeutung des YxxM-Signalmotivs, welches nur im humanen CD96-Molekül existiert, ist derzeit noch unklar.

Seit Chang und Kollegen im Jahr 2014 die inhibitorische Wirkung von CD96 in NK-Zellen erkannt haben, ist das allgemeine Interesse an CD96 stetig gewachsen. Daher können wir wahrscheinlich schon in naher Zukunft einige Wissenslücken über CD96 und vielleicht auch Th9-Zellen schließen.

5. Danksagung

6. Referenzen

1. Bruce Alberts AJ, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. Molecular Biology of the Cell. 4th ed. New York: Garland Science; 2002.
2. Rock KL, Reits E, Neefjes J. Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. Trends in immunology. 2016;37(11):724-37.
3. Kambayashi T, Laufer TM. Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? Nature reviews Immunology. 2014;14(11):719-30.
4. Abdi K, Singh N, Matzinger P. T-cell control of IL-12p75 production. Scandinavian journal of immunology. 2006;64(2):83-92.
5. Corthay A. A three-cell model for activation of naive T helper cells. Scandinavian journal of immunology. 2006;64(2):93-6.
6. Schwartz RH. T cell anergy. Annual review of immunology. 2003;21:305-34.
7. Riha P, Rudd CE. CD28 co-signaling in the adaptive immune response. Self/nonself. 2010;1(3):231-40.
8. Mou D, Espinosa J, Lo DJ, Kirk AD. CD28 negative T cells: is their loss our gain? American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2014;14(11):2460-6.
9. Lanier LL, O'Fallon S, Somoza C, Phillips JH, Linsley PS, Okumura K, et al. CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. Journal of immunology. 1995;154(1):97-105.
10. Borriello F, Sethna MP, Boyd SD, Schweitzer AN, Tivol EA, Jacoby D, et al. B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation. Immunity. 1997;6(3):303-13.
11. McLellan AD, Starling GC, Williams LA, Hock BD, Hart DN. Activation of human peripheral blood dendritic cells induces the CD86 co-stimulatory molecule. European journal of immunology. 1995;25(7):2064-8.
12. Boomer JS, Green JM. An enigmatic tail of CD28 signaling. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2010;2(8):a002436.
13. Beyersdorf N, Kerkau T, Hunig T. CD28 co-stimulation in T-cell homeostasis: a recent perspective. ImmunoTargets and therapy. 2015;4:111-22.
14. Ivashkiv LB. How ITAMs inhibit signaling. Science signaling. 2011;4(169):pe20.
15. van der Merwe PA, Bodian DL, Daenke S, Linsley P, Davis SJ. CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. The Journal of experimental medicine. 1997;185(3):393-403.
16. Collins AV, Brodie DW, Gilbert RJ, Iaboni A, Manso-Sancho R, Walse B, et al. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. Immunity. 2002;17(2):201-10.
17. Linsley PS, Bradshaw J, Greene J, Peach R, Bennett KL, Mittler RS. Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. Immunity. 1996;4(6):535-43.
18. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. The Journal of experimental medicine. 2000;192(2):303-10.
19. Rudd CE, Taylor A, Schneider H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. Immunological reviews. 2009;229(1):12-26.
20. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. Science (New York, NY). 2011;332(6029):600-3.
21. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. Immunity. 1995;3(5):541-7.
22. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. Science (New York, NY). 1995;270(5238):985-8.

23. Maxwell LJ, Singh JA. Abatacept for rheumatoid arthritis: a Cochrane systematic review. *The Journal of rheumatology*. 2010;37(2):234-45.
24. Weclawiak H, Kamar N, Ould-Mohamed A, Cardeau-Desangles I, Rostaing L. Biological agents in kidney transplantation: belatacept is entering the field. *Expert opinion on biological therapy*. 2010;10(10):1501-8.
25. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(4):227-42.
26. Shahinian A, Pfeffer K, Lee KP, Kundig TM, Kishihara K, Wakeham A, et al. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science (New York, NY)*. 1993;261(5121):609-12.
27. Green JM, Karpitskiy V, Kimzey SL, Shaw AS. Coordinate regulation of T cell activation by CD2 and CD28. *Journal of immunology*. 2000;164(7):3591-5.
28. Meinel E, Lengenfelder D, Blank N, Pirzer R, Barata L, Hivroz C. Differential requirement of ZAP-70 for CD2-mediated activation pathways of mature human T cells. *Journal of immunology*. 2000;165(7):3578-83.
29. Chen WJ, Jin W, Hardegen N, Lei K, Li L, Marinos N, et al. Conversion of Peripheral CD4(+)CD25(-) Naive T Cells to CD4(+)CD25(+) Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine*. 2003;198(12):1875-86.
30. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *American journal of clinical oncology*. 2016;39(1):98-106.
31. Dougall WC, Kurtulus S, Smyth MJ, Anderson AC. TIGIT and CD96: new checkpoint receptor targets for cancer immunotherapy. *Immunological reviews*. 2017;276(1):112-20.
32. Yu X, Harden K, Gonzalez LC, Francesco M, Chiang E, Irving B, et al. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nature immunology*. 2009;10(1):48-57.
33. Shibuya A, Campbell D, Hannum C, Yssel H, Franz-Bacon K, McClanahan T, et al. DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity*. 1996;4(6):573-81.
34. Shibuya K, Shirakawa J, Kameyama T, Honda S, Tahara-Hanaoka S, Miyamoto A, et al. CD226 (DNAM-1) is involved in lymphocyte function-associated antigen 1 costimulatory signal for naive T cell differentiation and proliferation. *The Journal of experimental medicine*. 2003;198(12):1829-39.
35. Iguchi-Manaka A, Kai H, Yamashita Y, Shibata K, Tahara-Hanaoka S, Honda S, et al. Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(13):2959-64.
36. Lakshmikanth T, Burke S, Ali TH, Kimpfler S, Ursini F, Ruggeri L, et al. NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(5):1251-63.
37. Gilfillan S, Chan CJ, Cella M, Haynes NM, Rapaport AS, Boles KS, et al. DNAM-1 promotes activation of cytotoxic lymphocytes by nonprofessional antigen-presenting cells and tumors. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(13):2965-73.
38. Levin SD, Taft DW, Brandt CS, Bucher C, Howard ED, Chadwick EM, et al. Vstm3 is a member of the CD28 family and an important modulator of T-cell function. *European journal of immunology*. 2011;41(4):902-15.
39. Liu S, Zhang H, Li M, Hu D, Li C, Ge B, et al. Recruitment of Grb2 and SHIP1 by the ITT-like motif of TIGIT suppresses granule polarization and cytotoxicity of NK cells. *Cell death and differentiation*. 2013;20(3):456-64.
40. Zhang Z, Wu N, Lu Y, Davidson D, Colonna M, Veillette A. DNAM-1 controls NK cell activation via an ITT-like motif. *The Journal of experimental medicine*. 2015;212(12):2165-82.
41. Johnston RJ, Comps-Agrar L, Hackney J, Yu X, Huseni M, Yang Y, et al. The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8(+) T cell effector function. *Cancer cell*. 2014;26(6):923-37.

42. Pauken KE, Wherry EJ. TIGIT and CD226: tipping the balance between costimulatory and coinhibitory molecules to augment the cancer immunotherapy toolkit. *Cancer cell*. 2014;26(6):785-7.
43. Wang PL, O'Farrell S, Clayberger C, Krensky AM. Identification and molecular cloning of tactile. A novel human T cell activation antigen that is a member of the Ig gene superfamily. *Journal of immunology*. 1992;148(8):2600-8.
44. Meyer D, Seth S, Albrecht J, Maier MK, du Pasquier L, Ravens I, et al. CD96 interaction with CD155 via its first Ig-like domain is modulated by alternative splicing or mutations in distal Ig-like domains. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(4):2235-44.
45. Seth S, Maier MK, Qiu Q, Ravens I, Kremmer E, Forster R, et al. The murine pan T cell marker CD96 is an adhesion receptor for CD155 and nectin-1. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007;364(4):959-65.
46. Martinet L, Smyth MJ. Balancing natural killer cell activation through paired receptors. *Nature reviews Immunology*. 2015;15(4):243-54.
47. Fuchs A, Cella M, Giurisato E, Shaw AS, Colonna M. Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155). *Journal of immunology*. 2004;172(7):3994-8.
48. Carlsten M, Bjorkstrom NK, Norell H, Bryceson Y, van Hall T, Baumann BC, et al. DNAX accessory molecule-1 mediated recognition of freshly isolated ovarian carcinoma by resting natural killer cells. *Cancer research*. 2007;67(3):1317-25.
49. El-Sherbiny YM, Meade JL, Holmes TD, McGonagle D, Mackie SL, Morgan AW, et al. The requirement for DNAM-1, NKG2D, and Nkp46 in the natural killer cell-mediated killing of myeloma cells. *Cancer research*. 2007;67(18):8444-9.
50. Chan CJ, Martinet L, Gilfillan S, Souza-Fonseca-Guimaraes F, Chow MT, Town L, et al. The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions. *Nature immunology*. 2014;15(5):431-8.
51. Eriksson EM, Keh CE, Deeks SG, Martin JN, Hecht FM, Nixon DF. Differential expression of CD96 surface molecule represents CD8(+) T cells with dissimilar effector function during HIV-1 infection. *PloS one*. 2012;7(12):e51696.
52. Blake SJ, Dougall WC, Miles JJ, Teng MW, Smyth MJ. Molecular Pathways: Targeting CD96 and TIGIT for Cancer Immunotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2016;22(21):5183-8.
53. Tada T, Takemori T, Okumura K, Nonaka M, Tokuhisa T. Two distinct types of helper T cells involved in the secondary antibody response: independent and synergistic effects of Ia- and Ia+ helper T cells. *The Journal of experimental medicine*. 1978;147(2):446-58.
54. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of immunology*. 1986;136(7):2348-57.
55. Caza T, Landas S. Functional and Phenotypic Plasticity of CD4(+) T Cell Subsets. *BioMed research international*. 2015;2015:521957.
56. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology*. 2009;27:485-517.
57. Shevach EM, Thornton AM. tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunological reviews*. 2014;259(1):88-102.
58. King C, Tangye SG, Mackay CR. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annual review of immunology*. 2008;26:741-66.
59. Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity*. 2014;41(4):529-42.
60. Schmitt E, Germann T, Goedert S, Hoehn P, Huels C, Koelsch S, et al. IL-9 production of naive CD4+ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma. *Journal of immunology*. 1994;153(9):3989-96.
61. Gessner A, Blum H, Rollinghoff M. Differential regulation of IL-9-expression after infection with *Leishmania major* in susceptible and resistant mice. *Immunobiology*. 1993;189(5):419-35.

62. Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, et al. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature immunology*. 2008;9(12):1341-6.
63. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nature immunology*. 2008;9(12):1347-55.
64. Uyttenhove C, Brombacher F, Van Snick J. TGF-beta interactions with IL-1 family members trigger IL-4-independent IL-9 production by mouse CD4(+) T cells. *European journal of immunology*. 2010;40(8):2230-5.
65. Schlapbach C, Gehad A, Yang C, Watanabe R, Guenova E, Teague JE, et al. Human TH9 cells are skin-tropic and have autocrine and paracrine proinflammatory capacity. *Science translational medicine*. 2014;6(219):219ra8.
66. You FP, Zhang J, Cui T, Zhu R, Lv CQ, Tang HT, et al. Th9 cells promote antitumor immunity via IL-9 and IL-21 and demonstrate atypical cytokine expression in breast cancer. *International immunopharmacology*. 2017;52:163-7.
67. Vegran F, Berger H, Boidot R, Mignot G, Bruchard M, Dosset M, et al. The transcription factor IRF1 dictates the IL-21-dependent anticancer functions of TH9 cells. *Nature immunology*. 2014;15(8):758-66.
68. Xiao X, Shi X, Fan Y, Zhang X, Wu M, Lan P, et al. GITR subverts Foxp3(+) Tregs to boost Th9 immunity through regulation of histone acetylation. *Nature communications*. 2015;6:8266.
69. Kim IK, Kim BS, Koh CH, Seok JW, Park JS, Shin KS, et al. Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein co-stimulation facilitates tumor regression by inducing IL-9-producing helper T cells. *Nature medicine*. 2015;21(9):1010-7.
70. Kaplan MH. The transcription factor network in Th9 cells. *Seminars in immunopathology*. 2017;39(1):11-20.
71. Chang HC, Sehra S, Goswami R, Yao W, Yu Q, Stritesky GL, et al. The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nature immunology*. 2010;11(6):527-34.
72. Staudt V, Bothur E, Klein M, Lingnau K, Reuter S, Grebe N, et al. Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity*. 2010;33(2):192-202.
73. Goswami R, Kaplan MH. Gcn5 is required for PU.1-dependent IL-9 induction in Th9 cells. *Journal of immunology*. 2012;189(6):3026-33.
74. Ramming A, Druz D, Leipe J, Schulze-Koops H, Skapenko A. Maturation-related histone modifications in the PU.1 promoter regulate Th9-cell development. *Blood*. 2012;119(20):4665-74.
75. Jabeen R, Goswami R, Awe O, Kulkarni A, Nguyen ET, Attenasio A, et al. Th9 cell development requires a BATF-regulated transcriptional network. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(11):4641-53.
76. McKercher SR, Torbett BE, Anderson KL, Henkel GW, Vestal DJ, Baribault H, et al. Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *The EMBO journal*. 1996;15(20):5647-58.
77. Veldhoen M. Interferon regulatory factor 4: combinational control of lymphocyte differentiation. *Immunity*. 2010;33(2):141-3.
78. Goswami R, Jabeen R, Yagi R, Pham D, Zhu J, Goenka S, et al. STAT6-dependent regulation of Th9 development. *Journal of immunology*. 2012;188(3):968-75.
79. Kaplan MH, Hufford MM, Olson MR. The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nature reviews Immunology*. 2015;15(5):295-307.
80. Noelle RJ, Nowak EC. Cellular sources and immune functions of interleukin-9. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(10):683-7.
81. Anuradha R, George PJ, Hanna LE, Chandrasekaran V, Kumaran P, Nutman TB, et al. IL-4-, TGF-beta-, and IL-1-dependent expansion of parasite antigen-specific Th9 cells is associated with clinical pathology in human lymphatic filariasis. *Journal of immunology*. 2013;191(5):2466-73.

82. Nowak EC, Weaver CT, Turner H, Begum-Haque S, Becher B, Schreiner B, et al. IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. *The Journal of experimental medicine*. 2009;206(8):1653-60.
83. Stephens GL, Swerdlow B, Benjamin E, Coyle AJ, Humbles A, Kolbeck R, et al. IL-9 is a Th17-derived cytokine that limits pathogenic activity in organ-specific autoimmune disease. *European journal of immunology*. 2011;41(4):952-62.
84. Lu LF, Lind EF, Gondek DC, Bennett KA, Gleeson MW, Pino-Lagos K, et al. Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature*. 2006;442(7106):997-1002.
85. Eller K, Wolf D, Huber JM, Metz M, Mayer G, McKenzie AN, et al. IL-9 production by regulatory T cells recruits mast cells that are essential for regulatory T cell-induced immune suppression. *Journal of immunology*. 2011;186(1):83-91.
86. Visekruna A, Ritter J, Scholz T, Campos L, Guralnik A, Poncette L, et al. Tc9 cells, a new subset of CD8(+) T cells, support Th2-mediated airway inflammation. *European journal of immunology*. 2013;43(3):606-18.
87. Lu Y, Hong B, Li H, Zheng Y, Zhang M, Wang S, et al. Tumor-specific IL-9-producing CD8+ Tc9 cells are superior effector than type-I cytotoxic Tc1 cells for adoptive immunotherapy of cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(6):2265-70.
88. Wilhelm C, Hirota K, Stieglitz B, Van Snick J, Tolaini M, Lahl K, et al. An IL-9 fate reporter demonstrates the induction of an innate IL-9 response in lung inflammation. *Nature immunology*. 2011;12(11):1071-7.
89. Licona-Limon P, Henao-Mejia J, Temann AU, Gagliani N, Licona-Limon I, Ishigame H, et al. Th9 Cells Drive Host Immunity against Gastrointestinal Worm Infection. *Immunity*. 2013;39(4):744-57.
90. Kim HS, Chung DH. IL-9-producing invariant NKT cells protect against DSS-induced colitis in an IL-4-dependent manner. *Mucosal immunology*. 2013;6(2):347-57.
91. Jones TG, Hallgren J, Humbles A, Burwell T, Finkelman FD, Alcaide P, et al. Antigen-induced increases in pulmonary mast cell progenitor numbers depend on IL-9 and CD1d-restricted NKT cells. *Journal of immunology*. 2009;183(8):5251-60.
92. Hultner L, Kolsch S, Stassen M, Kaspers U, Kremer JP, Mailhammer R, et al. In activated mast cells, IL-1 up-regulates the production of several Th2-related cytokines including IL-9. *Journal of immunology*. 2000;164(11):5556-63.
93. Stassen M, Muller C, Arnold M, Hultner L, Klein-Hessling S, Neudorfl C, et al. IL-9 and IL-13 production by activated mast cells is strongly enhanced in the presence of lipopolysaccharide: NF-kappa B is decisively involved in the expression of IL-9. *Journal of immunology*. 2001;166(7):4391-8.
94. Gounni AS, Nutku E, Koussih L, Aris F, Louahed J, Levitt RC, et al. IL-9 expression by human eosinophils: regulation by IL-1beta and TNF-alpha. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2000;106(3):460-6.
95. Rojas-Zuleta WG, Sanchez E. IL-9: Function, Sources, and Detection. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2017;1585:21-35.
96. Goswami R, Kaplan MH. A brief history of IL-9. *Journal of immunology*. 2011;186(6):3283-8.
97. Richard M, Grecis RK, Humphreys NE, Renauld JC, Van Snick J. Anti-IL-9 vaccination prevents worm expulsion and blood eosinophilia in *Trichuris muris*-infected mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(2):767-72.
98. Anuradha R, Munisankar S, Bhootra Y, Jagannathan J, Dolla C, Kumaran P, et al. IL-10- and TGFbeta-mediated Th9 Responses in a Human Helminth Infection. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(1):e0004317.
99. Rivera Vargas T, Humblin E, Vegran F, Ghiringhelli F, Apetoh L. TH9 cells in anti-tumor immunity. *Seminars in immunopathology*. 2017;39(1):39-46.
100. Purwar R, Schlapbach C, Xiao S, Kang HS, Elyaman W, Jiang X, et al. Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells. *Nature medicine*. 2012;18(8):1248-53.
101. Lu Y, Hong S, Li H, Park J, Hong B, Wang L, et al. Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(11):4160-71.

102. Yao W, Tepper RS, Kaplan MH. Predisposition to the development of IL-9-secreting T cells in atopic infants. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011;128(6):1357-60.e5.
103. Brough HA, Cousins DJ, Munteanu A, Wong YF, Sudra A, Makinson K, et al. IL-9 is a key component of memory TH cell peanut-specific responses from children with peanut allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2014;134(6):1329-38.e10.
104. Blumberg RS. Inflammation in the intestinal tract: pathogenesis and treatment. *Digestive diseases* (Basel, Switzerland). 2009;27(4):455-64.
105. Weigmann B, Neurath MF. Th9 cells in inflammatory bowel diseases. *Seminars in immunopathology*. 2017;39(1):89-95.
106. Gerlach K, Hwang Y, Nikolaev A, Atreya R, Dornhoff H, Steiner S, et al. TH9 cells that express the transcription factor PU.1 drive T cell-mediated colitis via IL-9 receptor signaling in intestinal epithelial cells. *Nature immunology*. 2014;15(7):676-86.
107. Nalleweg N, Chiriac MT, Podstawa E, Lehmann C, Rau TT, Atreya R, et al. IL-9 and its receptor are predominantly involved in the pathogenesis of UC. *Gut*. 2015;64(5):743-55.
108. Pastorelli L, Garg RR, Hoang SB, Spina L, Mattioli B, Scarpa M, et al. Epithelial-derived IL-33 and its receptor ST2 are dysregulated in ulcerative colitis and in experimental Th1/Th2 driven enteritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(17):8017-22.
109. Seidelin JB, Bjerrum JT, Coskun M, Widjaya B, Vainer B, Nielsen OH. IL-33 is upregulated in colonocytes of ulcerative colitis. *Immunology letters*. 2010;128(1):80-5.
110. Gerlach K, McKenzie AN, Neurath MF, Weigmann B. IL-9 regulates intestinal barrier function in experimental T cell-mediated colitis. *Tissue barriers*. 2015;3(1-2):e983777.
111. Suchin EJ, Langmuir PB, Palmer E, Sayegh MH, Wells AD, Turka LA. Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question. *Journal of immunology*. 2001;166(2):973-81.
112. Boardman DA, Jacob J, Smyth LA, Lombardi G, Lechler RI. What Is Direct Allorecognition? *Current transplantation reports*. 2016;3(4):275-83.
113. Wood KJ, Goto R. Mechanisms of rejection: current perspectives. *Transplantation*. 2012;93(1):1-10.
114. Askar M. T helper subsets & regulatory T cells: rethinking the paradigm in the clinical context of solid organ transplantation. *International journal of immunogenetics*. 2014;41(3):185-94.
115. Ramadan A, Zhang J, Griesenauer B, Kapur R, Hanenberg H, Sun J, et al. IL-33/ST2 activation of IL-9-secreting T cells alters the balance of fatal immunity and tumor immunity (TRAN1P.926). *The Journal of Immunology*. 2015;194(1 Supplement):140.8-8.
116. Mangus CW, Massey PR, Fowler DH, Amarnath S. Rapamycin resistant murine th9 cells have a stable in vivo phenotype and inhibit graft-versus-host reactivity. *PloS one*. 2013;8(8):e72305.
117. Poulin LF, Richard M, Le Moine A, Kiss R, McKenzie AN, Goldman M, et al. Interleukin-9 promotes eosinophilic rejection of mouse heart allografts. *Transplantation*. 2003;76(3):572-7.
118. Alexandra Kuznetsova PBB, Rune Haubo Bojesen Christensen. *ImerTest: Tests in Linear Mixed Effects Models*. 2.0-33 ed2016.
119. Gregory R, Warnes BB, Lodewijk Bonebakker, Robert Gentleman, Wolfgang Huber Andy Liaw, Thomas Lumley, Martin Maechler, Arni Magnusson, Steffen Moeller, Marc Schwartz and Bill Venables. *gplots: Various R Programming Tools for Plotting Data*. 3.0.1 ed2016.
120. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of experimental medicine*. 1992;176(6):1693-702.
121. Zimmermann J, Kuhl AA, Weber M, Grun JR, Loffler J, Haftmann C, et al. T-bet expression by Th cells promotes type 1 inflammation but is dispensable for colitis. *Mucosal immunology*. 2016;9(6):1487-99.
122. Peine M, Rausch S, Helmstetter C, Frohlich A, Hegazy AN, Kuhl AA, et al. Stable T-bet(+)GATA-3(+) Th1/Th2 hybrid cells arise in vivo, can develop directly from naive precursors, and limit immunopathologic inflammation. *PLoS biology*. 2013;11(8):e1001633.

123. Steinman RM, Witmer MD. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1978;75(10):5132-6.
124. Inaba K, Pack M, Inaba M, Sakuta H, Isdell F, Steinman RM. High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *The Journal of experimental medicine*. 1997;186(5):665-72.
125. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-52.
126. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell*. 1992;68(5):869-77.
127. Liu Z, Fan H, Jiang S. CD4(+) T-cell subsets in transplantation. *Immunological reviews*. 2013;252(1):183-91.
128. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Caddle LB, Coffman RL. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *International immunology*. 1993;5(11):1461-71.
129. Sebastian M, Lopez-Ocasio M. Helios Controls a Limited Subset of Regulatory T Cell Functions. 2016;196(1):144-55.
130. Milpied P, Renand A, Bruneau J, Mendes-da-Cruz DA, Jacquelin S, Asnafi V, et al. Neuropilin-1 is not a marker of human Foxp3+ Treg. *European journal of immunology*. 2009;39(6):1466-71.
131. Bruder D, Probst-Kepper M, Westendorf AM, Geffers R, Beissert S, Loser K, et al. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *European journal of immunology*. 2004;34(3):623-30.
132. Levisky JM, Shenoy SM, Pezo RC, Singer RH. Single-cell gene expression profiling. *Science (New York, NY)*. 2002;297(5582):836-40.
133. Vera M, Biswas J, Senecal A, Singer RH, Park HY. Single-Cell and Single-Molecule Analysis of Gene Expression Regulation. *Annual review of genetics*. 2016;50:267-91.
134. Blake SJ, Stannard K, Liu J, Allen S, Yong MC, Mittal D, et al. Suppression of Metastases Using a New Lymphocyte Checkpoint Target for Cancer Immunotherapy. *Cancer discovery*. 2016;6(4):446-59.
135. Campos Carrascosa L, Klein M, Kitagawa Y, Luckel C, Marini F, Konig A, et al. Reciprocal regulation of the Il9 locus by counteracting activities of transcription factors IRF1 and IRF4. 2017;8:15366.
136. Tanchot C, Rosado MM, Agenes F, Freitas AA, Rocha B. Lymphocyte homeostasis. *Seminars in immunology*. 1997;9(6):331-7.
137. Tan C, Wei L, Vistica BP, Shi G, Wawrousek EF, Gery I. Phenotypes of Th lineages generated by the commonly used activation with anti-CD3/CD28 antibodies differ from those generated by the physiological activation with the specific antigen. *Cellular & molecular immunology*. 2014;11(3):305-13.
138. Trickett A, Kwan YL. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *Journal of immunological methods*. 2003;275(1-2):251-5.
139. Shi G, Lovaas JD, Tan C, Vistica BP, Wawrousek EF, Aziz MK, et al. Cell-cell interaction with APC, not IL-23, is required for naive CD4 cells to acquire pathogenicity during Th17 lineage commitment. *Journal of immunology*. 2012;189(3):1220-7.
140. Xiao X, Balasubramanian S, Liu W, Chu X, Wang H, Taparowsky EJ, et al. OX40 signaling favors the induction of T(H)9 cells and airway inflammation. *Nature immunology*. 2012;13(10):981-90.
141. Smith SE, Hoelzinger DB, Dominguez AL, Van Snick J, Lustgarten J. Signals through 4-1BB inhibit T regulatory cells by blocking IL-9 production enhancing antitumor responses. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2011;60(12):1775-87.
142. Keck S, Schmalzer M, Ganter S, Wyss L, Oberle S, Huseby ES, et al. Antigen affinity and antigen dose exert distinct influences on CD4 T-cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(41):14852-7.
143. Wong MT, Ye JJ, Alonso MN, Landrigan A, Cheung RK, Engleman E, et al. Regulation of human Th9 differentiation by type I interferons and IL-21. *Immunology and cell biology*. 2010;88(6):624-31.
144. Blom L, Poulsen BC, Jensen BM, Hansen A, Poulsen LK. IL-33 induces IL-9 production in human CD4+ T cells and basophils. *PloS one*. 2011;6(7):e21695.

145. Angkasekwinai P, Chang SH, Thapa M, Watarai H, Dong C. Regulation of IL-9 expression by IL-25 signaling. *Nature immunology*. 2010;11:250.
146. Dearman RJ, Cumberbatch M, Maxwell G, Basketter DA, Kimber I. Toll-like receptor ligand activation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *Immunology*. 2009;126(4):475-84.
147. Netea MG, Van der Meer JW, Suttmuller RP, Adema GJ, Kullberg BJ. From the Th1/Th2 paradigm towards a Toll-like receptor/T-helper bias. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49(10):3991-6.
148. Murugaiyan G, Beynon V, Pires Da Cunha A, Joller N, Weiner HL. IFN-gamma limits Th9-mediated autoimmune inflammation through dendritic cell modulation of IL-27. *Journal of immunology*. 2012;189(11):5277-83.
149. Dillon S, Agrawal A, Van Dyke T, Landreth G, McCauley L, Koh A, et al. A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *Journal of immunology*. 2004;172(8):4733-43.
150. Re F, Strominger JL. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(40):37692-9.
151. Kiesler P, Fuss IJ, Strober W. Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *CMGH Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 2015;1(2):154-70.
152. Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(2):295-302.
153. Hue S, Ahern P, Buonocore S, Kullberg MC, Cua DJ, McKenzie BS, et al. Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(11):2473-83.
154. Leppkes M, Becker C, Ivanov II, Hirth S, Wirtz S, Neufert C, et al. RORgamma-expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F. *Gastroenterology*. 2009;136(1):257-67.
155. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Menon S, Caddle LB, Coffman RL. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity*. 1994;1(7):553-62.
156. Mikami Y, Kanai T, Sujino T, Ono Y, Hayashi A, Okazawa A, et al. Competition between colitogenic Th1 and Th17 cells contributes to the amelioration of colitis. *European journal of immunology*. 2010;40(9):2409-22.
157. Griseri T, Asquith M, Thompson C, Powrie F. OX40 is required for regulatory T cell-mediated control of colitis. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207(4):699-709.
158. Lee YK, Turner H, Maynard CL, Oliver JR, Chen D, Elson CO, et al. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity*. 2009;30(1):92-107.
159. Harbour SN, Maynard CL, Zindl CL, Schoeb TR, Weaver CT. Th17 cells give rise to Th1 cells that are required for the pathogenesis of colitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(22):7061-6.
160. Iqbal N, Oliver JR, Wagner FH, Lazenby AS, Elson CO, Weaver CT. T helper 1 and T helper 2 cells are pathogenic in an antigen-specific model of colitis. *The Journal of experimental medicine*. 2002;195(1):71-84.
161. Sawitzki B, Kieselbach B, Fisser M, Meisel C, Vogt K, Gaestel M, et al. IFN-gamma regulation in anti-CD4 antibody-induced T cell unresponsiveness. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2004;15(3):695-703.
162. Khabar KSA. Post-Transcriptional Control of Cytokine Gene Expression in Health and Disease. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2014;34(4):215-9.
163. Singh Y, Garden OA, Lang F, Cobb BS. MicroRNAs regulate T-cell production of interleukin-9 and identify hypoxia-inducible factor-2alpha as an important regulator of T helper 9 and regulatory T-cell differentiation. *Immunology*. 2016;149(1):74-86.
164. Sabzevari H, Kantor J, Jaigirdar A, Tagaya Y, Naramura M, Hodge J, et al. Acquisition of CD80 (B7-1) by T cells. *Journal of immunology*. 2001;166(4):2505-13.

165. Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunological reviews*. 2009;229(1):152-72.
166. Brugnani D, Airo P, Marino R, Notarangelo LD, van Lier RA, Cattaneo R. CD70 expression on T-cell subpopulations: study of normal individuals and patients with chronic immune activation. *Immunology letters*. 1997;55(2):99-104.
167. Dang NH, Torimoto Y, Deusch K, Schlossman SF, Morimoto C. Comitogenic effect of solid-phase immobilized anti-1F7 on human CD4 T cell activation via CD3 and CD2 pathways. *Journal of immunology*. 1990;144(11):4092-100.
168. Tanaka T, Kameoka J, Yaron A, Schlossman SF, Morimoto C. The costimulatory activity of the CD26 antigen requires dipeptidyl peptidase IV enzymatic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(10):4586-90.
169. Reinwald S, Wiethe C, Westendorf AM, Breloer M, Probst-Keppler M, Fleischer B, et al. CD83 expression in CD4+ T cells modulates inflammation and autoimmunity. *Journal of immunology*. 2008;180(9):5890-7.
170. Newman DK, Hamilton C, Newman PJ. Inhibition of antigen-receptor signaling by Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (CD31) requires functional ITIMs, SHP-2, and p56(lck). *Blood*. 2001;97(8):2351-7.
171. Chinen T, Kannan AK, Levine AG, Fan X, Klein U, Zheng Y, et al. An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nature immunology*. 2016;17(11):1322-33.
172. Bamias G, Cominelli F. Role of type 2 immunity in intestinal inflammation. *Current opinion in gastroenterology*. 2015;31(6):471-6.
173. Rosen MJ, Chaturvedi R, Washington MK, Kuhnhein LA, Moore PD, Coggeshall SS, et al. STAT6 deficiency ameliorates severity of oxazolone colitis by decreasing expression of claudin-2 and Th2-inducing cytokines. *Journal of immunology*. 2013;190(4):1849-58.
174. Okamura M, Yoh K, Ojima M, Morito N, Takahashi S. Overexpression of GATA-3 in T cells accelerates dextran sulfate sodium-induced colitis. *Experimental animals*. 2014;63(2):133-40.
175. Fort M, Lesley R, Davidson N, Menon S, Brombacher F, Leach M, et al. IL-4 exacerbates disease in a Th1 cell transfer model of colitis. *Journal of immunology*. 2001;166(4):2793-800.
176. Uppal V, Kreiger P, Kutsch E. Eosinophilic Gastroenteritis and Colitis: a Comprehensive Review. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2016;50(2):175-88.
177. Takatsu K, Nakajima H. IL-5 and eosinophilia. *Current opinion in immunology*. 2008;20(3):288-94.
178. Le Moine A, Surquin M, Demoor FX, Noel JC, Nahori MA, Pretolani M, et al. IL-5 mediates eosinophilic rejection of MHC class II-disparate skin allografts in mice. *Journal of immunology*. 1999;163(7):3778-84.
179. Gounni AS, Gregory B, Nutku E, Aris F, Latifa K, Minshall E, et al. Interleukin-9 enhances interleukin-5 receptor expression, differentiation, and survival of human eosinophils. *Blood*. 2000;96(6):2163-71.
180. Ramirez GA, Yacoub MR, Ripa M, Mannina D, Cariddi A, Saporiti N, et al. Eosinophils from Physiology to Disease: A Comprehensive Review. *BioMed research international*. 2018;2018:9095275.
181. Chang HC, Zhang S, Thieu VT, Slee RB, Bruns HA, Laribee RN, et al. PU.1 expression delineates heterogeneity in primary Th2 cells. *Immunity*. 2005;22(6):693-703.
182. Ma J, Wang R, Fang X, Sun Z. beta-catenin/TCF-1 pathway in T cell development and differentiation. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*. 2012;7(4):750-62.
183. Yu Q, Sharma A, Oh SY, Moon HG, Hossain MZ, Salay TM, et al. T cell factor 1 initiates the T helper type 2 fate by inducing the transcription factor GATA-3 and repressing interferon-gamma. *Nature immunology*. 2009;10(9):992-9.
184. Zhang J, He Z, Sen S, Wang F, Zhang Q, Sun Z. TCF-1 Inhibits IL-17 Gene Expression To Restrain Th17 Immunity in a Stage-Specific Manner. *Journal of immunology*. 2018;200(10):3397-406.
185. Xu L, Cao Y, Xie Z, Huang Q, Bai Q, Yang X, et al. The transcription factor TCF-1 initiates the differentiation of T(FH) cells during acute viral infection. *Nature immunology*. 2015;16(9):991-9.

186. Choi YS, Gullicksrud JA, Xing S, Zeng Z, Shan Q, Li F, et al. LEF-1 and TCF-1 orchestrate T(FH) differentiation by regulating differentiation circuits upstream of the transcriptional repressor Bcl6. 2015;16(9):980-90.
187. Jeannet G, Boudousquie C, Gardiol N, Kang J, Huelsken J, Held W. Essential role of the Wnt pathway effector Tcf-1 for the establishment of functional CD8 T cell memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(21):9777-82.
188. Zhou X, Yu S, Zhao DM, Harty JT, Badovinac VP, Xue HH. Differentiation and persistence of memory CD8(+) T cells depend on T cell factor 1. *Immunity*. 2010;33(2):229-40.
189. Reddy M, Eirikis E, Davis C, Davis HM, Prabhakar U. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. *Journal of immunological methods*. 2004;293(1-2):127-42.
190. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nature immunology*. 2011;12(6):492-9.
191. Bennett F, Luxenberg D, Ling V, Wang IM, Marquette K, Lowe D, et al. Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses. *Journal of immunology*. 2003;170(2):711-8.
192. Yi JS, Cox MA, Zajac AJ. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology*. 2010;129(4):474-81.
193. Perez-Garcia A, Osca G, Bosch-Vizcaya A, Kelleher N, Santos NY, Rodriguez R, et al. Kinetics of the CTLA-4 isoforms expression after T-lymphocyte activation and role of the promoter polymorphisms on CTLA-4 gene transcription. *Human immunology*. 2013;74(9):1219-24.
194. Gong J, Zhu C, Zhuang R, Song C, Li Q, Xu Z, et al. Establishment of an enzyme-linked immunosorbent assay system for determining soluble CD96 and its application in the measurement of sCD96 in patients with viral hepatitis B and hepatic cirrhosis. *Clinical and experimental immunology*. 2009;155(2):207-15.
195. Schwartzkopff S, Woyciechowski S, Aichele U, Flecken T, Zhang N, Thimme R, et al. TGF-beta downregulates KLRG1 expression in mouse and human CD8(+) T cells. *European journal of immunology*. 2015;45(8):2212-7.
196. Tan C, Aziz MK, Lovaas JD, Vistica BP, Shi G, Wawrousek EF, et al. Antigen-specific Th9 cells exhibit uniqueness in their kinetics of cytokine production and short retention at the inflammatory site. *Journal of immunology*. 2010;185(11):6795-801.
197. Jager A, Dardalhon V, Sobel RA, Bettelli E, Kuchroo VK. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *Journal of immunology*. 2009;183(11):7169-77.
198. O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science (New York, NY)*. 2010;327(5969):1098-102.
199. Baumjohann D, Ansel KM. MicroRNA-mediated regulation of T helper cell differentiation and plasticity. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(9):666-78.
200. Komatsu N, Mariotti-Ferrandiz ME, Wang Y, Malissen B, Waldmann H, Hori S. Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(6):1903-8.
201. Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, et al. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature*. 2007;445(7129):771-5.
202. Shi G, Cox CA, Vistica BP, Tan C, Wawrousek EF, Gery I. Phenotype switching by inflammation-inducing polarized Th17 cells, but not by Th1 cells. *Journal of immunology*. 2008;181(10):7205-13.
203. Bending D, De la Pena H, Veldhoen M, Phillips JM, Uyttenhove C, Stockinger B, et al. Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(3):565-72.
204. Hirota K, Duarte JH, Veldhoen M, Hornsby E, Li Y, Cua DJ, et al. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nature immunology*. 2011;12(3):255-63.

205. Koch MA, Tucker-Heard G, Perdue NR, Killebrew JR, Urdahl KB, Campbell DJ. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nature immunology*. 2009;10(6):595-602.
206. Yao W, Zhang Y, Jabeen R, Nguyen ET, Wilkes DS, Tepper RS, et al. Interleukin-9 is required for allergic airway inflammation mediated by the cytokine TSLP. *Immunity*. 2013;38(2):360-72.
207. Michot JM, Bigenwald C, Champiat S, Collins M, Carbonnel F, Postel-Vinay S, et al. Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: a comprehensive review. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2016;54:139-48.
208. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *The New England journal of medicine*. 2015;373(1):23-34.
209. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann K, McDermott D, et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *The New England journal of medicine*. 2015;372(21):2006-17.
210. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*. 1999;11(2):141-51.
211. Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, et al. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science (New York, NY)*. 2001;291(5502):319-22.
212. Joller N, Hafler JP, Brynedal B, Kassam N, Spoerl S, Levin SD, et al. Cutting edge: TIGIT has T cell-intrinsic inhibitory functions. *Journal of immunology*. 2011;186(3):1338-42.
213. Harjunpää H, Blake SJ, Ahern E, Allen S, Liu J, Yan J, et al. Deficiency of host CD96 and PD-1 or TIGIT enhances tumor immunity without significantly compromising immune homeostasis. *Oncot Immunology*. 2018;7(7):e1445949.
214. Dixon KO, Schorer M, Nevin J, Etminan Y, Amoozgar Z, Kondo T, et al. Functional Anti-TIGIT Antibodies Regulate Development of Autoimmunity and Antitumor Immunity. *Journal of immunology*. 2018;200(8):3000-7.
215. Mayes PA, Hance KW, Hoos A. The promise and challenges of immune agonist antibody development in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2018.
216. Stanko K, Iwert C, Appelt C, Vogt K, Schumann J, Strunk FJ, et al. CD96 expression determines the inflammatory potential of IL-9-producing Th9 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018;115(13):E2940-e9.
217. Cella M, Presti R, Vermi W, Lavender K, Turnbull E, Ochsenbauer-Jambor C, et al. Loss of DNAM-1 contributes to CD8+ T-cell exhaustion in chronic HIV-1 infection. *European journal of immunology*. 2010;40(4):949-54.
218. Welch MJ, Teijaro JR, Lewicki HA, Colonna M, Oldstone MB. CD8 T cell defect of TNF-alpha and IL-2 in DNAM-1 deficient mice delays clearance in vivo of a persistent virus infection. *Virology*. 2012;429(2):163-70.
219. Ramsbottom KM, Hawkins ED, Shimon R, McGrath M, Chan CJ, Russell SM, et al. Cutting edge: DNAX accessory molecule 1-deficient CD8+ T cells display immunological synapse defects that impair antitumor immunity. *Journal of immunology*. 2014;192(2):553-7.
220. Bauche D, Marie JC. Transforming growth factor beta: a master regulator of the gut microbiota and immune cell interactions. *Clinical & translational immunology*. 2017;6(4):e136.
221. Fallmann J, Sedlyarov V, Tanzer A, Kovarik P, Hofacker IL. AREsite2: an enhanced database for the comprehensive investigation of AU/GU/U-rich elements. *Nucleic acids research*. 2016;44(D1):D90-5.

7. Appendix

7.1 Konfiguration der Durchflusszytometer

7.1.1 LSRFortessa (18 Farben)

Laser	Detektor	1. Pass	2. Pass	Detektiertes Signal
blau 488 nm (100 mW)	A	635 LP	670/30 BP	PerCP
	B	505 LP	525/50 BP	FITC
	C	leer	488/10 BP	SSC/ FSC
Gelb/grün 561 nm (100 mW)	A	750	780/60	
	B	685	710/50	
	C	635	670/30	
	D	600	610/20	
	E	leer	585/15	PE
	F	leer	leer	
	G	leer	leer	
	H	leer	leer	
Rot 639 nm (40 mW)	A	750	780/60	APC-Cy7
	B	685	710/50	AF700
	C	leer	670/14	APC
Violett 404 nm (50 mW)	A	705	780/60	BV785
	B	685	710/50	BV711
	C	635	660/20	
	D	600	610/20	BV605
	E	505	525/50	eFluor506
	F	leer	450/50	BV421
	G	leer	leer	
	H	leer	leer	
UV 355 nm (60 mW)	A	505	530/30	
	B	leer	405/20	
	C	leer	leer	

7.1.2 LSR II (12 Farben)

Laser	Detektor	1. Pass	2. Pass	Detektiertes Signal
Blau 488 nm (20 mW)	A	735	780/60	
	B	635	670/14	PerCP
	C	600	610/20	
	D	550	575/26	PE
	E	505	530/30	FITC
	F	leer	488/10	SSC/ FSC
	G	leer	leer	
	H	leer	leer	
Rot 640 nm (40 mW)	A	735	780/60	APC-Cy7
	B	680	730/40	AF700
	C	leer	660/20	APC
Violett 405 nm (25 mW)	A	685	710/40	BV711
	B	635	655/40	
	C	505	525/50	eFl506
	D	leer	440/40	BV421
	E	leer	leer	
	F	leer	leer	
	G	leer	leer	
	H	leer	leer	

7.1.3 FACSCalibur (4 Farben)

Laser	Detektor	1. Pass	2. Pass	Detektiertes Signal
Blau 488 nm (15 mW)	A	560 SP	530/30 BP	FITC
	B		480/10 BP	SSC/ FSC
	C	640 LP	585/42 BP	PE
	D	640 LP	670 LP	PerCP
Rot 640 nm (10 mW)	C		660/20 BP	APC

7.2 Datenbanksuche für AU-reiche Elemente in der 3' UTR der murinen *l19* mRNA

Chromosome	Start	End	Motif	Motif-family	Strand	Gene	Transcript	Annotation	Type
chr13	56479288	56479294	AATAAA	AIWTAAA	-	ENSMUSG000000021538	ENSMUST000000022019	Exon^3UTR	protein_coding
chr13	56479328	56479333	ATTTA	ATTTA	-	ENSMUSG000000021538	ENSMUST000000022019	Exon^3UTR	protein_coding
chr13	56479336	56479343	TATTTAT	WWTTTWW	-	ENSMUSG000000021538	ENSMUST000000022019	Exon^3UTR	protein_coding
chr13	56479337	56479342	ATTTA	ATTTA	-	ENSMUSG000000021538	ENSMUST000000022019	Exon^3UTR	protein_coding
chr13	56479345	56479352	TATTTAT	WWTTTWW	-	ENSMUSG000000021538	ENSMUST000000022019	Exon^3UTR	protein_coding
chr13	56479346	56479351	ATTTA	ATTTA	-	ENSMUSG000000021538	ENSMUST000000022019	Exon^3UTR	protein_coding

Quelle: <http://rna.tbi.univie.ac.at/AREsite> (221)

8. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Katarina Stanko, die Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Ich versichere, dass diese Arbeit (oder Teile davon) nie Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war(en). Ich habe mich nicht anderwärts um den Titel *doctor rerum naturalium* beworben und besitze keinen entsprechenden Titel.

Der Inhalt der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt Universität zu Berlin vom 06.07.2009 ist mir bekannt.

Berlin, den _____

(Katarina Stanko)